

*Pseudomonas putida* NRRL B-13 SUŞUNDA EKSTRASELLÜLER LİPAZ  
ENZİM AKTİVİTESİNİN SAPTANMASI

FAZİLET YILDIZ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
2011

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

*Pseudomonas putida* NRRL B-13 SUŞUNDA EKSTRASELLÜLER LİPAZ  
ENZİM AKTİVİTESİNİN SAPTANMASI

FAZİLET YILDIZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Yrd. Doç Dr. MUSA SARI

SİVAS

2011

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof Dr. Sevtap BAKIR .....

Üye : Doç. Dr. Lütfiye GENCER .....

Üye( Danışman) : Yrd. Doç Dr. Musa SARI .....

#### ONAY

Bu tez çalışması ..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mustafa DEĞİRMENCİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 24-09-2008 tarihli ve 009 sayılı toplantısında kabul edilen Fen/Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

**Canım Babacığma....**

## ÖZET

**Tezin Adı:** *Pseudomonas putida* NRRL B-13 Suşunda Ekstrasellüler Lipaz Enzim Aktivitesinin Saptanması.

Fazilet YILDIZ

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Musa SARI

2011 , 61 sayfa

Enzimler canlı hücreler tarafından sentezlenen, protein yapısında olan ve biyolojik aktivite gösteren moleküllerdir. Lipazlar ise yağları ve yağ asit esterlerini hidroliz eden enzim grubudur. Doğada lipazlar, reaksiyonlarının özgüllüklerinde önemli ölçüde çeşitlilik gösteren türlü kaynaklardan elde edilebilmektedir. Endüstrinin hemen hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, stabil ve ucuz olmaları ve fazla miktarda elde edilebilmeleridir.

Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle, biyoteknolojinin endüstriyel enzimler ile ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar daha da önem kazanmaktadır. Lipazlar süt endüstrisi, gıda endüstrisi, kozmetik ve parfüm sanayi, dericilik, deterjan sanayi, çevre yönetimi ve biyomedikal uygulamalar gibi birçok endüstri alanında önemlidir.

Gram negatif bakterilerden *Pseudomonas* cinsi bakterilerin iyi lipaz üreticisi olarak bilinmesi bu bakterilerin biyoteknolojik çalışmalarda kullanılabilme imkânlarını araştırmaya yöneltmiştir.

Bu çalışmada *Pseudomonas putida* NRRL B-13 suşunun ilk önce durağan fazda ekstrasellüler lipaz enzimi aktivitesi, daha sonra logaritmik fazda enzim aktivitesi ölçülerek aktivitenin hangi fazda daha yüksek olduğu karşılaştırmalar yapılarak araştırılmıştır. Ayrıca enzim aktivitesine etkisini belirlemek amacıyla logaritmik fazda çeşitli pH aralıklarında ve farklı sıcaklıklarda çalışılmıştır.  $MgCl_2$  ve  $CaSO_4$  kofaktörlerinin de aktivite üzerine etkisi araştırılmıştır. Aktivitenin hangi fazda yüksek olduğu saptanarak yüksek aktiviteye sahip olan enzimlerin endüstriyel alanda kullanılması amaçlanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** enzim, lipaz, *Pseudomonas putida*

## ABSTRACT

**Name of Thesis:** Determination of Extracellular Lipase Enzyme Activity in *Pseudomonas putida* NRRL B-13 Strains

Fazilet YILDIZ

MSc Thesis , Department of Biology

Supervisor: Asst. Prof. Musa SARI

2011, 61 pages

Enzymes are synthesized by living cells obeying protein structure and the molecules that exhibiting biological activity. Lipases are group of the enzyme that hydrolysis the oils and fatty acid esters. In nature, lipases showing a significant variation in sensitivity, specificity reactions can be obtained from many sources. Enzymes used in almost every field of industry are usually obtained from microorganisms. Because the catalytic activity of enzymes from microorganisms is very high, stable and cheap so that it can be obtained in high ammount.

Enzyme technology and economic value of increasing the diversity of areas in the development of products is very high due to a variety of biotechnology research in the field of industrial enzymes is more important. Lipases are important in the milk, food, cosmetics, perfume, leather, detergent industry and also in environmental management and in biomedical applications.

From gram-negative bacteria *Pseudomonas* genus known as the best lipase producer and possibilities of using these bacteria in biotechnological research studies.

In this study, from strains of *Pseudomonas putida* NRRL B-13 stationary phase and logarithmic phase, extracellular lipase activity was measured.

In addition, in order to observe effect of enzyme activity in logarithmic phase various pH ranges and at different temperatures were studied. Effects of MgCl<sub>2</sub> and CaSO<sub>4</sub> on the enzyme activity also were investigated.

**Key words:** enzyme, lipase, *Pseudomonas putida*

## TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca zengin bakıő açısıyla beni aydınlatan, yüksek lisans tez çalıőmamda gerekli bütün yardım, tavsiye ve yönlendirmeleri yapan, karşılaőtığım problemlerin çözümünde deneyimlerinden yararlandığım sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Musa SARI' ya ilgi ve sabrından dolayı teşekkür ederim.

Aynı zamanda tez çalıőmalarım boyunca bana desteğini esirgemeyen Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İlhan SEZGİN hocama, iş arkadaşlarıma, Araştırma Görevlisi Sevgi DURNA ve Ergün KASAKA' ya teşekkür ederim.

Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde çalıőan ve emeği geçen herkese teşekkür ederim.

Ayrıca büyük bir özveri ve sabırla beni her zaman destekleyen, yanımda olan canım aileme ve arkadaşlarıma teőekkürlerimi sunarım.



## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VI
TEŞEKKÜR.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
KISALTMALAR DİZİNİ.....	XI
SİMGELER DİZİNİ.....	XII
1.GİRİŞ	
1.1. Enzimler.....	1
1.2. Lipazlar.....	9
1.3. Bazı Enzimlerin ve Lipazların Endüstrideki Önemi .....	15
1.4. Bakteriyal Lipazlar.....	16
1.5. Pseudomonadaceae Familyası .....	17
2. MATERYAL- METOD .....	22
3.BULGULAR.....	26
SONUÇ-TARTIŞMA .....	40
KAYNAKLAR.....	44
ÖZGEÇMİŞ.....	48

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Kimyasal bir tepkime için tepkime koordinat diyagramı.....	3
Şekil.2: Enzim-katalizli ve katalizsiz tepkimelerin tepkime koordinat diyagramının karşılaştırılması.....	5
Şekil.3: Bir enzim-katalizli tepkimenin başlangıç hızında substrat konsantrasyonunun etkisi.....	7
Şekil.4: Lineweaver- Burk grafiği .....	8
Şekil.5: Trigliseridlerin lipotik hidrolizi .....	11
Şekil.6: Mikroorganizma sayısı bakımından bakteriyel büyüme .....	21
Şekil.3.1: 273 nm dalga boyundaki p- nitrofenolbütiratın standart eğrisi.....	26
Şekil.3.2: 410 nm dalga boyundaki p- nitrofenolbütiratın standart eğrisi.....	26
Şekil.3.3: Farklı dalga boylarında 25 µM p- nitrofenolbütirat ' ın absorbands değerleri.....	27
Şekil.3.4: Durağan Faz 37 °C' de Absorbans Ölçümü.....	27
Şekil.3.5: Durağan Faz 37 °C' de Absorbans Ölçümü (Enzim miktarı artırıldı).....	28
Şekil.3.6: Durağan Faz için Michealis-Menten grafiği.....	28
Şekil.3.7: Logaritmik Faz için Michealis-Menten grafiği.....	29
Şekil.3.8: Durağan faz 37 °C' de farklı substrat derişimleri ile absorbands ilişkisi.....	29
Şekil.3.9: Logaritmik fazın 37 °C' de farklı substrat derişimleri ile absorbands ilişkisi.....	30
Şekil.3.10: Logaritmik fazın 37 °C' de farklı substrat derişimleri ile absorbands ilişkisi.....	30
Şekil.3.11: Logaritmik Faz Sıcaklık Deneyi (37°C) Absorbans Ölçümü.....	31
Şekil.3.12: Logaritmik Faz Sıcaklık Deneyi (oda sıcaklığı) Absorbans Ölçümü.....	31
Şekil.3.13: Logaritmik Faz Sıcaklık Deneyi (-20°C) Absorbans Ölçümü.....	32
Şekil.3.14: Logaritmik fazın pH=4 zaman ile absorbands ilişkisi .....	32
Şekil.3.15: Logaritmik fazın pH=5 zaman ile absorbands ilişkisi.....	33
Şekil.3.16: Logaritmik fazın pH=6 zaman ile absorbands ilişkisi.....	33
Şekil.3.17: Logaritmik fazın pH=8 zaman ile absorbands ilişkisi.....	34
Şekil.3.18: Logaritmik fazın pH=9 zaman ile absorbands ilişkisi.....	34
Şekil.3.19: Logaritmik fazın pH=10 zaman ile absorbands ilişkisi.....	35
Şekil.3.20: Logaritmik faza MgCl <sub>2</sub> (0,01mM) eklenerek elde edilen zaman ile absorbands ilişkisi .....	35
Şekil.3.21: Logaritmik faza CaSO <sub>4</sub> (0,01mM) eklenerek elde edilen zaman ile absorbands ilişkisi .....	36

<b>Şekil.3.22:</b> Logaritmik faza CaSO <sub>4</sub> (0,02mM) eklenerek elde edilen zaman ile absorbans ilişkisi.....	36
<b>Şekil.3.23:</b> Logaritmik faza CaSO <sub>4</sub> (0,04mM) eklenerek elde edilen zaman ile absorbans ilişkisi.....	37
<b>Şekil.3.24:</b> Logaritmik Faz (kofaktör olmadan) Kontrol .....	37
<b>Şekil.3.25:</b> Durağan faz için Lineweaver- Burk eşitliği.....	38
<b>Şekil.3.26:</b> Logaritmik faz için Lineweaver- Burk eşitliği.....	39

## KISALTMALAR DİZİNİ

S: Substrat

P: Ürün

ES: Enzim- Substrat Kompleksi

$K_m$  : Michealis-Menten sabitesi

pNNP: para- nitrofenil palmitat

PHB: poli-  $\beta$ - hidroksibutiratı

PEG : Peptidoglikan

EDTA: Etilen diamin tetra asetik asit

## SİMGELER DİZİNİ

atm: Atmosfer basıncı

$^{\circ}\text{C}$ : Santigrat

$^{\circ}\text{K}$ : Kelvin

M: Molar

R: Gaz Sabiti

T: Sıcaklık

$K_{\text{den}}$  : Denge Sabiti

$\Delta G^{\circ}$ : Standart serbest enerji değışikliği

$\mu\text{M}$ : mikromolar

[S]: Substrat derişimi

$V_o$  : İlk hız

# 1. GİRİŞ

## 1.1.ENZİMLER

Enzimler, hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen protein yapısında moleküllerdir (Eren Kıran ve ark, 2006). Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere günlük ve ekonomik hayata girmiştir ( Wiseman, 1987).

Enzimler birçok biyokimyasal süreçte rol oynarlar. Besinsel moleküllerin parçalandığı tepkime basamaklarının yüzlercesini katalizleyip kimyasal enerjiyi korurlar, dönüştürürler ve böylece basit öncüllerden biyolojik makromoleküller üretilir. Enzimler çoğu kez sentetik ve inorganik katalizörlerden çok daha önemli olağanüstü katalitik güce sahiptir. Substratları için yüksek özgüllüğe sahiptir; kimyasal tepkimeleri yüksek oranda hızlandırır; pH ve sıcaklığın optimum koşullarında sıvı çözeltilerde işlev görür. Biyolojik olmayan katalizörlerin çok azı bu özelliklere sahiptir.

Biyolojik kataliz ilk olarak midenin salgılarıyla etin sindirimi üzerine yapılan çalışmalarda 1700'lerin sonunda keşfedilip, tanımlandı. Sonraki araştırmalar 1800'lerde tükürük ve çeşitli bitki özütleriyle nişastanın şekere dönüşümü çalışmalarıyla devam ettirildi. 1850'lerde Louis Pasteur şekerin mayayla alkole fermentlenmesinin " fermentler" tarafından katalizlendiği sonucuna vardı. Pasteur bu fermentlerin canlı maya hücrelerinin yapılarından ayrılamaz olduğunu ileri sürdü ve bu görüş vitalizm ( kadercilik ; canlılarda fiziksel ve kimyasal güçlerin dışında kontrol edici bir gücün varlığına inanış) olarak adlandırıldı ve uzun yıllar ön planda tutuldu. Daha sonra 1897'de Eduard Buchner maya özütlerinin şekeri alkole fermentlediğini, bununla fermentasyonun hücreden uzaklaştırıldığında işlevine devam eden moleküller tarafından sağladığını keşfetti. Frederic W. Kühne bu molekülleri enzimler olarak adlandırdı.

James Sumner tarafından 1926'da üreazın kristallendirilmesi ve izolasyonu ile ilk enzim çalışmalarında yeni bir açılım sağlandı. 1930'larda John Northrop ve Moses Kunitz pepsin, tripsin ve diğer sindirim enzimlerini kristallendirdiler ve bunlarında protein olduklarını buldular. Bu periyotta J.B.S. Haldane "Enzimler" başlığında bir bilimsel eser yazdı.

20.yüzyılın son yarısında hücrenel metabolizmanın tepkimesini katalizleyen enzimlerdeki araştırmalar yoğunlaşmıştı.

Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç, bütün enzimler proteindir. Katalitik aktiviteleri, doğal protein konformasyonunun sağlamlığına bağlıdır. Eğer enzim denatüre olursa veya altbirimlerine ayrılırsa katalitik aktivitesi genellikle kaybolur. Eğer enzim bileşeni olan aminoasitlerine dönüştürülürse, katalitik aktivitesi yok olur.

Enzimler diğer proteinler gibi yaklaşık olarak 12 000- 1 000 000 arasında değişen molekül ağırlığına sahiptir. Enzimler bir veya birden fazla substratı etkilerken aktivite göstermek için bazı hallerde  $Fe^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$  veya  $Zn^{+2}$  gibi bir veya daha fazla inorganik iyon ya da kofaktöre bazen de koenzim adı verilen kompleks organik ve metalloorganik moleküllere gereksinim duyarlar. Bazı enzimler aktivite için hem koenzime hem de bir ya da daha fazla metal iyonuna ihtiyaç duyarlar. Enzim proteinine çok sıkı hatta kovalent olarak bağlanan bir koenzim veya metal iyonu prostetik grup olarak adlandırılır ( Nelson ve Cox, 2005). Eğer enzim kofaktörü veya koenzimi ile birlikte ve katalitik bakımdan tamamen aktif durumda ise enzimin bu haline holoenzim adı verilmektedir. Kofaktör veya koenzim enzimden ayrılacak olursa ve enzim inaktif hale gelecek olursa enzimin yalnız proteinden meydana gelmiş bu inaktif haline apoenzim adı verilmektedir (Gözükara, 1994). Enzimle katalizlenen bir tepkimenin ayrıca diğer bir özelliği aktif yer olarak adlandırılan enzim üzerindeki sınırlandırılmış bir bölgenin içinde meydana gelmesidir. Enzimin aktif merkezine bağlanan ve enzimin üzerinde aktivite gösterdiği molekül substrat olarak adlandırılır. Aktif bölge yüzeyi, yan grupları substrata bağlanan ve bunun kimyasal transformasyonunu sağlayan amino asit kalıntılarıyla oluşturulmuştur ( Nelson ve Cox, 2005).

Katalizörün işlevi, tepkime hızını artırmaktır. Katalizör tepkime dengesini etkilemez  $S \longrightarrow P$  gibi herhangi bir tepkime, tepkime süresince enerji değişimlerini gösteren bir tepkime koordinat diyagramıyla ifade edilebilir. Biyolojik sistemlerdeki enerji, serbest enerjiye (G) göre tanımlanır. Koordinat diyagramında sistemin serbest enerjisi tepkimenin ilerlemesine karşın işaretlenmiştir. Hem ileri hem de geri tepkimeler için başlama noktası zemin durumu olarak adlandırılır. Bu durum, S veya P gibi moleküllerin sistemin serbest enerjisine katkısının verilen eşik durumunun altında olduğu bölgedir. Bir sistemin sıcaklık ve basınçta bir değişim olmadan, başlangıç durumundan dengeye doğru hareketindeki enerji değişimine serbest enerji değişimi ( $\Delta G$ ) denir.  $\Delta G'$  nin büyüklüğü özel bir kimyasal tepkimeye ve sistemin başlangıçta dengeden ne kadar uzakta olduğuna bağlıdır. Kendiliğinden

olan tepkimelerde ürünler tepkenlere göre daha az enerji içerir. Bu tür tepkimeler egzergoniktir. Tepkenlerden ürünlere serbest enerjideki azalma, bir negatif değer olarak ifade edilir. Endergonik tepkimeler, enerjinin alınmasını gerektirir ve bu nedenle  $\Delta G$  değerleri pozitifdir.

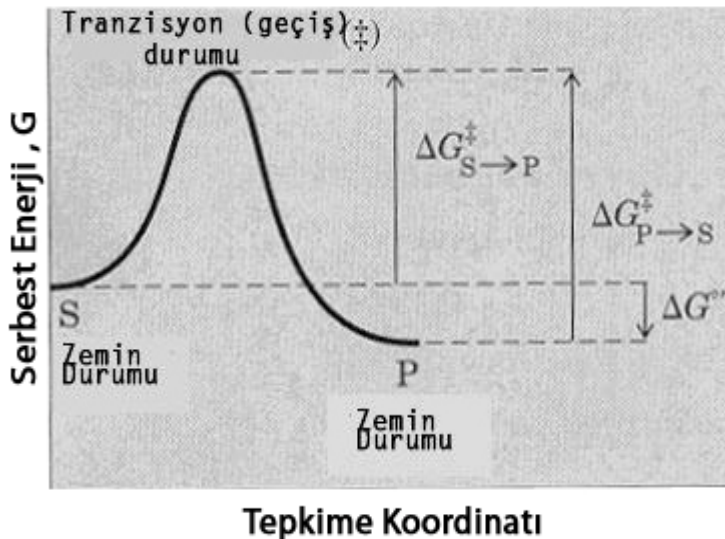
Standart koşullar altında ( $298K^{\circ} = 25C^{\circ}$ ) tepkenler ve ürünlerin derişimleri 1 M olduğunda, gazlar için 101.3 kilopaskal veya 1 atm kısmi basınç altında sistemi dengeye ulaştırın kuvvet, standart serbest enerji değışikliği ( $\Delta G^{\circ}$ ) olarak ifade edilir. Standart serbest enerji değışikliği tepkimenin denge sabitinin basit alternatif matematiksel bir yolla ifadesidir:

$$\Delta G^{\circ} = - RT \ln K_{den}$$

Verilen bir kimyasal tepkime için denge sabiti 1 ise tepkimenin serbest enerji değışimi sıfırdır.

Bir tepkimenin  $K_{den} > 1.0$  ise  $\Delta G^{\circ}$  negatiftir ve tepkime ileri gider. Ürünler tepkenlere göre daha az enerji içermekte ve tepkime standart koşullar altında kendiliğinden meydana gelmektedir.

Bir tepkimenin  $K_{den} < 1.0$  ise  $\Delta G^{\circ}$  pozitifdir ve tepkime geri gider. Tepkime ürünlerinin tepkenlere göre daha fazla serbest enerji içerdđi anlamına gelir ve tepkimeye 1 M derişiminde bileşiklerle başlanılmışsa tepkime geri yönde ilerler.  $\Delta G^{\circ}$  bir sabittir ve tepkimenin hangi yönde gideceğini ve ne zaman dengeye ulaşacağını belirtir.

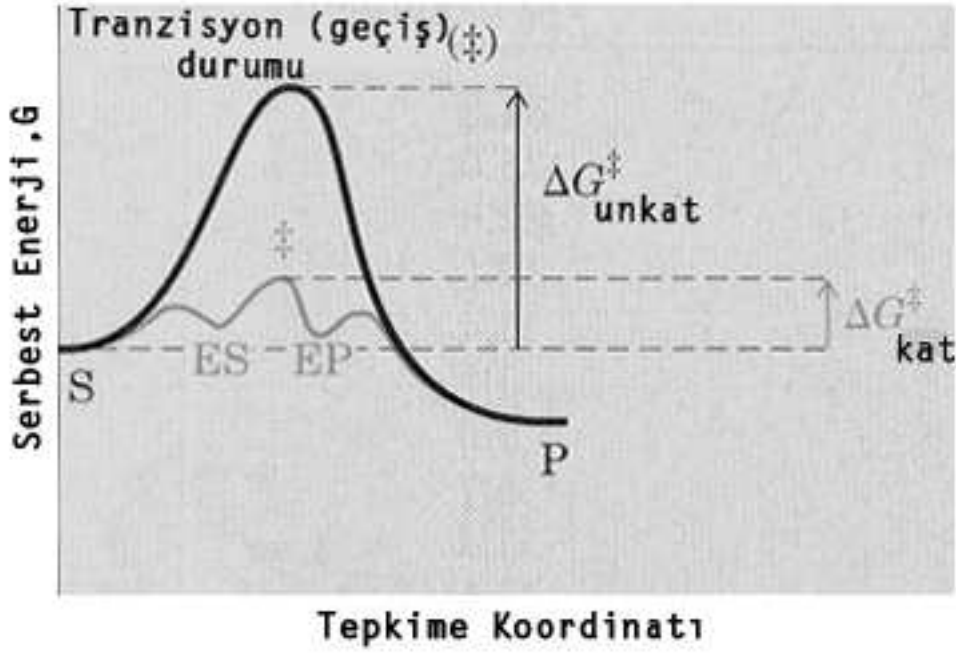


**Şekil 1: Kimyasal bir tepkime için tepkime koordinat diyagramı (Nelson, L.D. ve Cox, M.M., 2005)**

S  $\rightarrow$  P arasındaki denge, bunların zemin durumunun serbest enerjilerindeki farklılığı yansıtır. Şekil 1'de gösterilen örnekte, P'nin zemin durumunun serbest



enerjisi S'ninkinden daha düşüktür, böylece tepkime için  $\Delta G^{\circ}$  negatiftir ve denge P tarafını tercih eder. Dengenin pozisyon ve yönü herhangi bir katalizörden etkilenmez. Tercih edilen denge S $\longrightarrow$ P dönüşümünün saptanabilen bir hızda oluşacağı anlamına gelmez. Tepkimenin hızı tamamıyla farklı parametrelere bağlıdır. S ve P arasında reaktif grupların sıralanması, kararlı olmayan geçici yük oluşumu, bağların yeniden düzenlenmesi ve tepkimenin her iki yönde ilerlemesinde gerekli diğer dönüşümler için gereken bir enerji engeli vardır. Tepkimenin ilerlemesi için moleküller bu engeli aşmalıdır ve böylece daha yüksek bir enerji düzeyi kazanmalıdır. Enerji eğrisinin tepe noktası; S veya P durumuna dönüşme olasılığının eşit olduğu bir noktadır ( her iki yönde de yokuş aşağı) ve bu geçiş durumu olarak adlandırılır. Geçiş durumu herhangi bir belirgin kararlılıkta kimyasal bir özellik değildir ve tepkimenin ara ürünleriyle ( ES ve EP gibi) karıştırılmamalıdır. Basitçe bağların yıkılması, bağ oluşumu ve yük gelişimi gibi olayların olduğu hızlı moleküler geçiş anları hem substrat hem de ürüne eşit oranda dönüşmenin olduğu belirli bir noktaya ilerletilir. Zemin durumu ve geçiş durumunun enerji düzeyleri arasındaki fark aktivasyon enerjisi olarak adlandırılır. Tepkime hızı bu aktivasyon enerjisini yansıtır; yüksek aktivasyon enerjisi yavaş bir tepkimeyi gösterir. Tepkime hızı sıcaklığı artırarak artırılabilir, böylece enerji engelini aşmak için yeterli enerjiye sahip moleküllerin sayısı artar. Alternatif olarak aktivasyon enerjisi katalizörün ilavesiyle daha da düşürülebilir.



**Şekil 2: Enzim-katalizli ve katalizsiz tepkimelerin tepkime koordinat diyagramının karşılaştırılması (Nelson, L.D. ve Cox, M.M., 2005)**

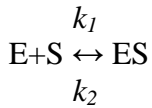
Katalizörler tepkime hızını aktivasyon enerjisinin düşürülmesiyle artırır. Enzimler tepkime dengesini etkilemezler.  $S \rightarrow P$  tepkimesini katalizleyen herhangi bir enzim aynı zamanda  $P \rightarrow S$  tepkimesini de katalizler. Enzimlerin rolü S ve P' nin dönüşümünü hızlandırmaktır. Enzimler bu süreçte kullanılmazlar ve denge noktası etkilenmez. Bununla birlikte tepkime; uygun enzim varlığında tepkime hızının artması nedeniyle daha hızlı denge kazanır. Pratikte herhangi bir tepkime; tepkime arabileşiklerinin oluşumunu ve yıkımını içeren birçok basamağa sahiptir.  $S \rightleftharpoons P$  tepkimesi enzimler tarafından katalizlendiği zaman ES ve EP kompleksi arabileşiklerdir. Bir tepkime bir çok adımdan meydana geldiği zaman; bütün hızı en yüksek aktivasyon enerjili basamak ( veya basamaklar) tarafından saptanır; bu hız sınırlayıcı basamak olarak adlandırılır. Benzer hız sınırlayıcı basamak tepkime şartlarıyla değişebilir ve bir çok enzim için çeşitli basamaklar benzer aktivasyon enerjisine sahip olabilirler, bunun anlamı bu basamakların hepsinin kısmen hız kısıtlayıcı olmasıdır. Aktivasyon enerjileri kimyasal tepkimeler için enerji engelidirler; bu engeller yaşam için son derece önemlidir. Molekülün kararlılığı kendi aktivasyon engelini büyüklüğü ile artar. Böyle enerji engelleri olmazsa, kompleks makromoleküller daha basit moleküler formlarına kendiliğinden dönüşür. Kompleks ve yüksek düzendeki yapılar ile hücrelerin metabolik süreçleri

varolamaz. Enzimler hücre yaşamı için gerekli olan tepkimeler için seçicilikle düşük aktivasyon enerjilerini oluştururlar.

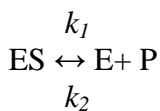
Enzimler olağanüstü katalizörlerdir. Enzimler oldukça hızlı olup benzer yapılardaki substratlar arasında ayırım yapabilen çok özgül moleküllerdir. Enzim substrat etkileşiminden kaynaklanan enerjiye bağlanma enerjisi ( $\Delta G_B$ ) denir. Bağlanma enerjisi tepkimelerin aktivasyon enerjisini düşürmek için enzimler tarafından kullanılan serbest enerjinin ana kaynağıdır. Enzimlerin katalitik güçlerinin çoğu enzim ve substratı arasındaki etkileşimler ve çoklu zayıf bağların oluşumunda salınan serbest enerjiden kaynaklanır. Bu bağlanma enerjisi katalizin yanı sıra özgülüğe katkıda bulunur. Zayıf etkileşimler tepkimenin geçiş durumunda en elverişli hale getirilirler; enzim aktif bölgeleri sadece substrat için tamamlayıcı değil aynı zamanda bir enzimatik tepkime sırasında substratların ürünler tarafına geçiş yaptığı geçiş durumları için de tamamlayıcıdır ( Nelson ve Cox, 2005).

Kinetik deneylerde temel yaklaşımlardan biri de genellikle substrat derişimi [S], enzim derişiminden [E] çok daha büyük olduğu zaman;  $V_o$  olarak gösterilen ilk hızı ölçmektir. Substratın göreceli düşük derişimlerinde  $V_o$ , substrattaki artışla hemen hemen doğrusal artar. Yüksek substrat derişimlerinde  $V_o$  substrattaki artışa cevap olarak giderek daha küçük miktarda artar. Sonuçta öyle bir noktaya ulaşır ki [S]' de ki artış  $V_o$ ' da ihmal edilebilecek kadar küçük bir artışa neden olur. Bu  $V_o$  bölgesi maksimum hız,  $V_{max}$ ' a yakındır.

Henry ve Brown adlı araştırmacılar 1902 yılında enzim ve substrat ile enzim-substrat kompleksi arasında bir dengenin olduğunu belirtmişlerdir. Daha sonra 1913 yılında Michealis-Menten bu tanımı daha fazla geliştirerek bugün kendi adları ile anılan sabite ve eşitliği tanımlamışlardır (Gözükara, 1994). Michealis ve Menten; enzimin ilk olarak enzim- substrat kompleksi oluşturmak için substratıyla göreceli hızlı geri dönüşümlü bir basamakta birleştiğini ileri sürdüler.



Sonra ES kompleksi daha yavaş ikinci bir basamakta yıkılır serbest enzim ve tepkime ürününü (P) verir.

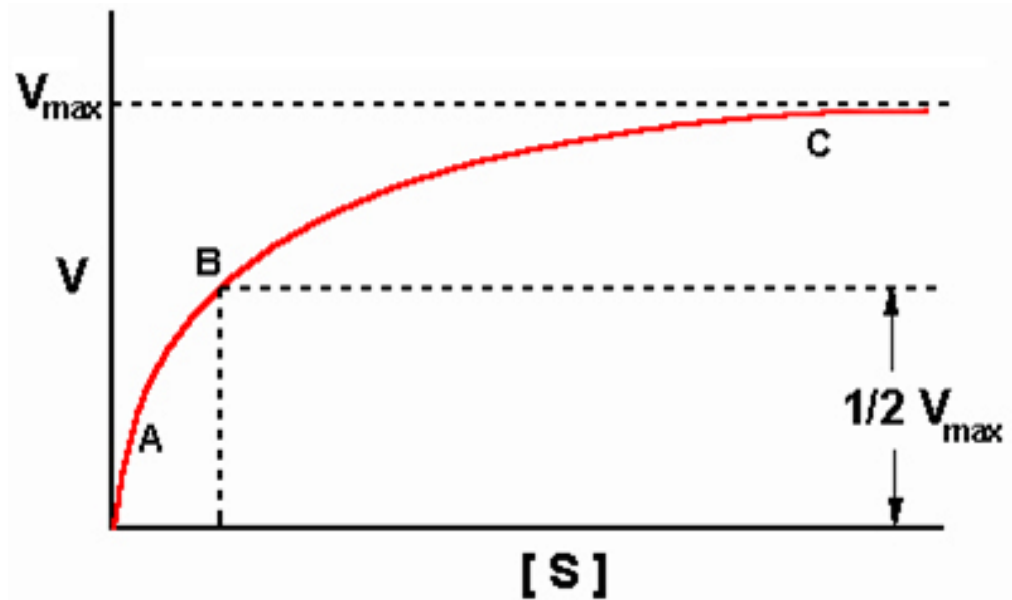


Daha yavaş olan ikinci tepkimeden dolayı tüm tepkimenin hızı sınırlanır, tüm hız ikinci basamakta tepkiyen türlerin derişimiyle yani ES ile orantılı olmalıdır.

Enzim maksimal hız ile çalışırken yüzeyine bağlı substrat konsantrasyonunun yarısına Michealis-Menten sabitesi adı verilir ve  $K_m$  ile gösterilir. Substrat konsantrasyonuna göre  $V$  başlangıç enzim reaksiyon hızı arasındaki ilişki ise

$$V_o = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

denklemleri ile gösterilir ve bu eşitlik Michealis-Menten eşitliği olarak bilinmektedir. Michealis-Menten eşitliğiyle matematiksel olarak gösterilebilen  $[S]$  ve  $V_o$  arasındaki ilişkiyi ifade eden eğri, bir çok enzim için aynı genel şekle sahiptir (dikdörtgen hiperboliğe yönelir).  $K_m$  Michealis sabiti olarak adlandırılır.



**Şekil 3: Bir enzim-katalizli tepkimenin başlangıç hızında substrat konsantrasyonunun etkisi**

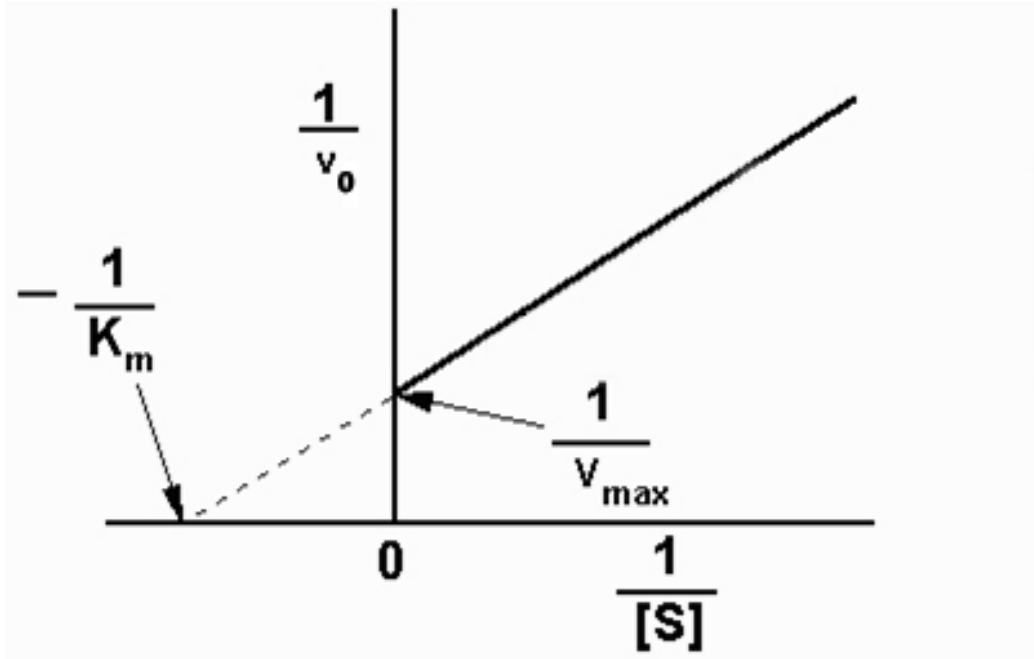
Michealis-Menten eşitliği deneysel verilerin grafiklendirilmesinde daha yararlı eşitliklere dönüştürülebilir. Genel bir dönüşüm basitçe Michealis-Menten eşitliğinin her iki tarafının tersinin alınmasından elde edilir.

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{max} [S]} + \frac{1}{V_{max} [S]}$$

Bu şu şekilde basitleştirilir:

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{max} [S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

ve Michealis-Menten eşitliğinin bu şekli Lineweaver- Burk eşitliği olarak adlandırılır.



**Şekil 4: Lineweaver- Burk grafiği**

Bu çizgi  $K_m/V_{max}$  eğimine sahiptir.  $1/V_o$  ekseninde kesim noktası  $V_{max}$ 'tır ve  $1/[S]$  ekseninde kesim noktası  $-1/K_m$ 'dir ( Nelson ve Cox, 2005).

$K_m$  değerinin bilinmesi enzimlerin saflaştırılmasında, dokularda enzim aktivitesinin saptanmasında, ilaç imalatında, enzim inhibitörlerinin belirlenmesinde önemlidir ( Zengin Ulakoğlu, 2006).

Her enzim için aktivitelerinin maksimum olduğu pH değerleri vardır. Bu değerlerin üzerinde ve altında aktivite düşer. Bununla beraber bütün enzimlerin pH-aktivite eğrileri aynı şekilde değildir (Bhat, 2000). Yüksek sıcaklıklarda biyoteknolojik işlemleri gerçekleştirmek pek çok fayda sağlamaktadır. Sıcaklığın artırılması organik bileşiklerin çözünürlüğü ve biyolojik olarak kullanılabilme

açısından önemli etkilere sahiptir. Sıcaklığın artması viskozitenin düşmesini ve organik bileşiklerin difüzyon katsayısının artmasını da beraberinde getirmektedir. Sonuç olarak küçük alanlarda yüksek reaksiyon hızı gerçekleştirilmektedir (Niehaus ve ark., 1999). Enzimler ile katalizlenen reaksiyonun hızı 0 – 40 °C arasında yükselir. Fakat 40 °C de enzim zarar görmeye başlar. Böylece reaksiyon yavaşlar ve 60 °C de enzim tamamen bozular. 40 °C bu enzim için optimum ısıdır (Bhat, 2000). Bu noktada çözüm olarak mikroorganizmalardan elde edilen enzimler büyük ilgi çekmektedir (Eren Kıran ve ark, 2006).

Enzimlerin yapılarının aydınlatılmasına paralel olarak enzim katalizli reaksiyonların kinetik ve termodinamik açıdan incelenmesi çalışmaları da hızla ilerlemiştir. Enzimlerin katalitik güçleri gerçekten şaşırtıcıdır. Enzimler molekülleri parçalar, birleştirir veya belirli grupları bir molekülden diğerine taşırlar. Katalitik fonksiyonları bakımından enzimler 6 ana grupta toplanmışlardır:

1. Oksiredüktazlar: Redoks reaksiyonlarını katalizler.
2. Transferazlar: Fonksiyonel grupların transferinde görev yaparlar.
3. Hidrolazlar: Hidroliz reaksiyonlarını katalizler. Bağlara su ekleyerek koparılmalarını katalizlerler.
4. Liyazlar: Çifte bağa katılma ve çifte bağ oluşum reaksiyonlarını katalizlerler.
5. İzomerazlar: İzomerleşme reaksiyonlarını katalizler
6. Ligazlar: Yüksek enerjili fosfatların enerjisini kullanarak karbon ile C,O,S,N arasında bağ oluşumunu katalizleyen enzimlerdir.

## **1.2.Lipazlar**

Lipazlar suda çözünmeyen trigliseritlerin, di ve mono-açilgliseridlere, serbest yağ asitlerine ve gliserole hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Lipazlar, Uluslararası Biyokimya Birliği Enzim Komitesince verilen hidrolazlar (E.C.3), ester bağlarını parçalayanlar ( E.C.3.1. ), karboksilik ester hidrolazlar (E.C.3.1.1.) ve triaçilgliserol lipazlar (E.C.3.1.1.3) içinde yer almaktadırlar. Lipazlar; geniş spektrumdaki substratları kullanabilme kabiliyetleri, lipit bileşenlerinin sentezinde veya hidrolizinde yüksek regio ve enantioselektif aktiviteye sahip olmaları ve bunlara ek olarak geniş ortam şartları altında stabil kalabilmeleri nedeniyle önemlidirler (Saraç ve ark., 2008).

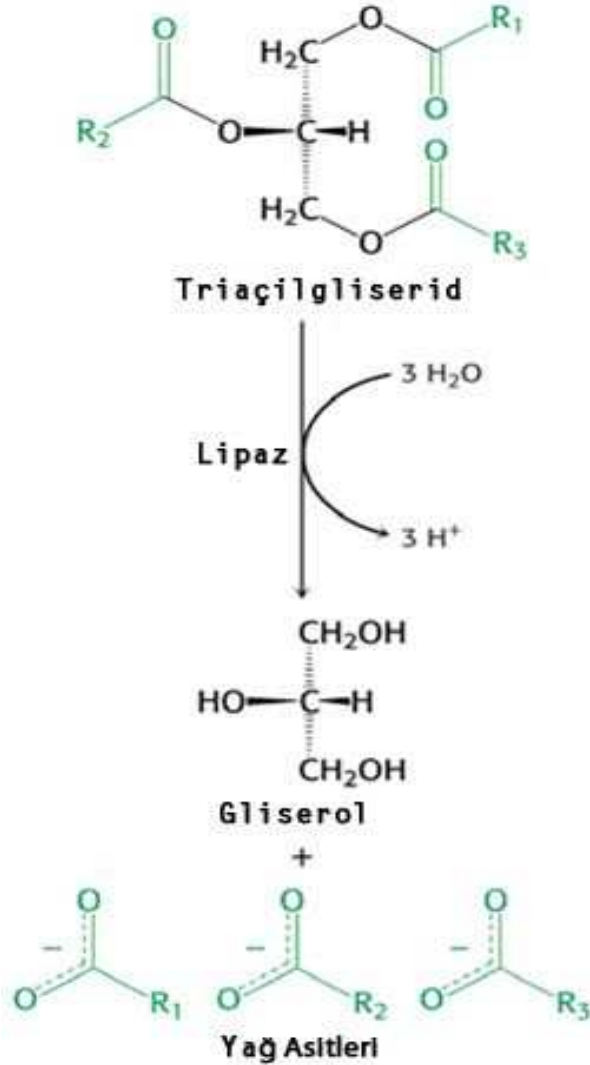
Lipazlar, yağlar ve yağ asidi esterlerini hidroliz ederler. Enzim, emülsiyonun yağ-su geçiş fazında katalizi gerçekleştirir ve enzim reaksiyonunun hızı, oluşan

yüzey alanına bağımlıdır (Eren Kıran ve ark, 2006). Lipazlar yağ asitlerinin zincir uzunluğu, doyma derecesi, yağ asidinin pozisyonu ve substratın fiziksel durumuna uygun spesifiklik gösterirler. 4-10 C atomlu yağ asitleri daha uzun C zincirli yağ asitlerinden daha hızlı bir şekilde hidroliz olarak yağın yapısından ayrılır ve serbest hale geçerler (Abbas ve ark., 2002).

Lipazlar serin hidrolazları sınıfı içinde yer alır ve bu nedenle hiçbir kofaktöre ihtiyaç duymazlar (Saxena ve ark., 2008). Lipazların doğal substratları olan trigliseridler, suda çok düşük çözünürlüğe sahiptir. Doğal şartlar altında lipazlar, çözünmeyen bir substratlı faz ile enzimin çözünmediği sıvı faz arasındaki arabirimde bulunan ester bağlarının hidrolizini katalizler. Bazı deneysel şartlar altında örneğin su yokluğunda reaksiyonu tersine çevirebilmektedirler. Ters çevirme reaksiyonları, esterifikasyon ve yağ asitleri ile gliserolden gliseridlerin oluşmasına yol açar. Substrat ve sıvı faz arasındaki bir arabirim üzerinde lipaz reaksiyonunun oluşu, reaksiyonun kinetik analizi ve denemede zorluklara neden olur. Alışılmış endüstriyel lipazlar, katı ve sıvı yağlar üzerine etki eden ve onların başlangıçta gliserid ve yağ asitlerinin yerine konulan maddeler için hidrolize ederler ve son olarak gliserol ve yağ asitlerinin toplam hidrolizlerini gerçekleştirirler ( Elibol ve ark., 2008) .

Doğada lipazlar, reaksiyonlarının özgüllüklerinde önemli ölçüde çeşitlilik gösteren türlü kaynaklardan elde edilebilmektedir. Bu özellik genellikle enzim özgüllüğü olarak ifade edilmektedir. Bu nedenle, yağ asitlerinin bulunduğu taraftan bazı lipazlar kısa zincirli yağ asitlerine (asetik, bütirik, kaprik, kaproik, kaprilik vs.) afinite gösterirler; diğer birçok lipazlar özgül değilken ve yağ asitlerini trigliseridlerden rastgele ayırırken bazıları ayrılmamış yağ asitlerini (oleik, linoleik, linolenik vs.) tercih ederler. Lipazlar, trigliseridlerin gliserol taraflarından sıkça pozisyonel özgüllük gösterirler ve gliserolün 1 veya 3 pozisyonundaki karbonu üzerinde bulunan yağ asitlerine veya her iki pozisyonunda ve yağ asiti dışında gliserol molekülünün 2 pozisyonundaki karbonuna etki eder. Bununla birlikte açıl grubunun rastgele uzaklaştırılması sayesinde, monogliserid olan 2 pozisyonundaki yağ asidini gliserol molekülünün 1 veya 3 pozisyonundaki yağ asidini iterek yeniden düzenler. Açıl grubunun uzaklaştırılması yavaş bir işlemdir ve mevcut lipazlar gliserolün 2-mono yağ asit esterlerinin üzerine etki etmez, hidroliz yavaşlar ve gliseride 1 ve/veya 3 no'lu pozisyonunda lipazın etki etmesini kolaylaştırmak için açıl grubunun uzaklaşmasının tamamlanmasını bekler. Lipazların en önemli özelliklerinden biri

hidroliz tepkimelerini hidrofobik ara yüzelerde yüksek bir etkinlikle yürütmesidir. Bu özellik ilk defa Wilstaetter ve ark. (1923) tarafından belirtilmiş, daha sonra da kanıtlanmıştır. Mevcut yağ miktarı, arabirimdeki lipaz aktivitesini belirler. Bu arabirim alanı, çalkalama gibi emülsifiye edicilerin kullanımıyla doyumluk sınırına kadar önemli ölçüde artırılabilir. Doyumluk sınırı, içeriği oluşturan maddelerin fiziksel şartlarının dağılımına bağlıdır. Bu nedenle emülsifiye edici ajanların kullanımıyla, lipazların aktiviteleri artırılabilir (Saxena ve ark., 2008).



**Şekil 5: Triglisericidlerin lipotik hidrolizi (Elibol ve ark., 2008)**

Lipazlar yukarıda da bahsedildiği gibi, triglisericidlerin diglisericidlere, monoglisericidlere, gliserol ve yağ asitlerine hidrolizlerini katalizler ve belirli şartlar altında ters reaksiyonla gliserol ve yağ asitlerinden gliseridlerin oluşumu ile esterifikasyonu yönetir (Şekil 5). Lipazlar ester bağlarına etki ettiği için, yağların ayrıştırılmasında, interesterifikasyonda (transesterifikasyon) peynirde farklı



aromaların geliştirilmesinde, köpek maması yapımı için biftek yağının tadının değiştirilmesinde vs. kullanılmaktadır. Günümüz uygulamalarından biri de organik asit ve alkollerden farklı değerlerde eklenmiş esterlerin sentezi ve susuz organik çözücüler için lipazların kullanımını gerektirmektedir. Araştırmalar, bitki, hayvan ve mikrobiyal lipazların bilhassa bakteriyel ve fungal lipazların üzerinde uygulanmaktadır. Her ne kadar pankreatik lipazlar alışlageldiği gibi çeşitli maksatlar için kullanılsa da, günümüzde mikrobiyal lipazların çok yönlü özellikleri, kolay nesil vermeleri ve sınırsız gereçlerin olmasından dolayı ticari uygulamalarda tercih edildikleri kabul edilmektedir (Elibol ve ark., 2008).

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olmaları, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleridir (Wiseman,1987). Bu mikroorganizmalar yalnızca enzim üretme yeteneklerine göre değil, mikroorganizmaların toksik ve patojen olmamasına göre de seçilmiştir. Bugün endüstride kullanılan birçok enzim mikrobiyal kökenli olduğu için, endüstriyel enzimlerin kullanımında, mikroorganizma kullanımı artmıştır (Demain ve Solomon ,1981 ). Ekstremofilik mikroorganizmalar; volkanların yüksek sıcaklıklarında, kutupların düşük sıcaklıklarında, çok düşük ve çok yüksek pH değerlerinde (pH 0-3 veya pH 10-12) veya çok yüksek tuz konsantrasyonlarında (%5-30) yaşamak için adapte olmuşlardır (Niehaus ve ark.,1999). Bu şekilde farklı ekolojik koşullarda yaşayan mikroorganizmalar termofilik, asidofilik, alkalifilik ve halofilik bakteriler şeklinde sınıflandırılmışlardır (Zeikus, 1979). Farklı ekolojik koşullarda yaşayan termoasidofilik ve alkalifilik bakterilerden elde edilen enzimler ekstrem pH ve sıcaklık koşullarına dayanıklı olduğu için endüstriyel alanda yoğun olarak kullanılmaya başlanmıştır ( Kindle,1983). Ticari öneme sahip olan enzimlerin çoğu, hidrolazlar şeklinde tanımlanmakta olup, mikrobiyal kökenlidir. Bu enzimlerin çoğu ekstrasellüler olarak bulunur ve yüksek moleküler ağırlığa sahip substratlarla görev yaparlar. Ekstrasellüler enzimler, besiyeri ve hücre duvarının dışı ile bağlantı halinde olan enzimler olarak tanımlanır ( John ve Sons. 1998; Madsen ve ark. 1973) . Bugüne kadar 2000'den fazla enzim tanımlanmış ve bunlardan yaklaşık 100 tanesi ticari olarak kullanıma uygun bulunmuştur. Fakat günümüzde bunlardan sadece 18 tanesi endüstriyel amaçla üretilmektedir ( Zeman ve McCrea,1985).

Ticari olarak kullanılan enzimlerin %59' unu proteazlar, %28'ini karbohidrazlar,%3'ünü lipazlar ve % 10'unu ise diğ er enzimler oluşturmaktadır. Karbohidrazlar grubuna giren  $\alpha$  –amilaz üretimi %13 ile önemli bir yer tutmaktadır ( Wiseman,1987).

Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değ erinin çok yüksek olması nedeniyle biyoteknolojinin endüstriyel enzimler ile ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar daha da önem kazanmaktadır. Özellikle son yıllarda stratejik alan şeklinde değ erlendirilen rekombinant DNA teknolojisinden yararlanılarak enzim üretimi büyük boyutlara ulaşmış ve kullanımını giderek yaygınlaşmıştır ( Gessese,1998).

Lipazlar hayvan, bitki ve mikroorganizma kökenli olabilirler. Doğada yaygın olarak bulunmalarına rağmen sadece mikrobiyal lipazlar ticari öneme sahiptirler. Ticari olarak kullanılabilen lipazlar, genellikle mikroorganizmalardaki geniş çeşitlilikteki ekstraselüler lipazlardır. Mikroorganizmalar substrat spesifitesi, reaksiyon hızı, termal stabilitesi, optimum pH' sı vb. çeşitliliklere sahip geniş spekturumda lipaz üretirler. Mikrobiyal lipazların yüksek biyoteknolojik potansiyelleri; organik solventlerde stabil olmaları, kofaktöre gereksinim duymamaları, geniş substrat spesifitesine sahip olmaları ve yüksek enantioselektive göstermelerinden kaynaklanmaktadır.

Lipaz üreten mikroorganizmalar bakteri, maya ve küflerdir. Biyoteknolojik uygulamalarda ve organik kimyada en çok tercih edilen lipazlar bakteriyel ve fungal orijinli olanlardır.

Lipaz üreten mikroorganizmalar, endüstriyel atıklar, bitkisel yağ işleme fabrikaları, süt ürünleri, yağlarla kontamine olmuş topraklar başta olmak üzere değişik topraklar, yağ içeren tohumlar, çürümüş gıdalar, kompost yığınları, kömür madenleri ve sıcak su kaynakları gibi çeşitli habitatlarda bulunabilmektedirler. Süt yağı ve zeytinyağı gibi lipitler, lipaz üretimini uyarmaları nedeniyle lipaz aktivitesi gösteren mikroorganizmalar için iyi bir habitatır. Lipazlar genel olarak, bir organik azot kaynağı varlığında ve yağlar, yağ asitleri, gliserol veya tweenler gibi lipidik karbon kaynağının bulunması halinde üretilmektedirler.

Son yıllarda teknolojinin gelişmesi ile birlikte enzimlere olan ilgi yoğun bir artış göstermektedir. Bu enzimler içerisinde lipazlar yukarıda bahsedilen geniş kullanım alanları nedeniyle, endüstriyel uygulamalar açısından önemli bir enzim grubudur. Bakterilerden özellikle Gram negatiflerle ilgili çok sayıda lipaz çalışması

mevcuttur. Gram negatif bakterilerden *Pseudomonas* cinsi bakteriler iyi lipaz üreticisi olarak bilinirler. Gram pozitif bakterilerin özellikle *Bacillus* ve *Staphylococcus* cinsi bakteriler ile ilgili lipaz çalışmaları bilinmektedir (Saraç ve ark,2008).

Bir araştırmada kantitatif ekstraselüler lipaz aktivitesinin belirlenmesi için izolatların ekstraselüler lipaz aktiviteleri, *p*-nitrofenil palmitat'ın substrat olarak kullanıldığı spektrofotometrik yöntemle 410 nm dalga boyunda ölçüm yapılarak belirlenmiştir. Bu ölçüm temel olarak *p*-nitrofenil esterlerinin enzimatik hidrolizi sonucunda meydana gelen *p*-nitrofenol'ün 410 nm' de kolorimetrik olarak tespit edilmesine dayanmaktadır. Lipolitik aktivitesi belirlenen izolatlar Nutrient Broth'da 30 °C' de 27 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin belirlenmesinde izolatların en yüksek lipaz aktivitesi gösterdiği zaman dilimi olan geç logaritmik faz seçilmiştir. İnkübasyondan sonra kültürler 10000 rpm' de 10 dk +4 °C' de santrifüj edilerek süpernatant elde edilmiştir. Süpernatant ekstraselüler enzim kaynağı olarak kullanılmış ve lipaz aktivitesi spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Substrat solüsyonu iki ayrı solüsyonun hazırlanıp karıştırılmasıyla elde edilmiştir. 1. solüsyon için 30 mg *p*NNP 10 ml izopropil alkolde çözülmüştür. 2. solüsyon için de 0.1 g Arabic Gum 0.4 ml Triton X-100 ve 90 ml Tris-HCL (50mM, pH8.0) kullanılmıştır. Elde edilen solüsyonlar karıştırılmıştır. Solüsyon 2 saat stabil kalabildiği için kullanım öncesinde taze olarak hazırlanılmıştır. Substrat solüsyonundan 9 ml alınarak 1 ml süpernatant ile karıştırılmış ve 30 °C' de 30 dakika 130 rpm'de çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon periyodu sonunda ekstraselüler lipaz aktivitesi spektrofotometrik olarak 410 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Bir lipaz ünitesi (U), dakikada 1µmol *p*-nitrofenol açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Saraç ve ark,2008).

### 1.3. Bazı Enzimlerin ve Lipazların Endüstrideki Önemi

Lipolitik enzimlerin aktivitesi süt endüstrisinde önemlidir. Yüksek lipolizis çeşitli peynirlerin üretiminde zorunlu olmaktadır. Peynir yapımında kullanılan renninin kütesinde, proteolitik enzimler gibi lipazlarda mevcuttur. Lipazlar tereyağına aroma kazandırmada, çikolata endüstrisinde, kremalarda, karamellerde kullanım alanına sahiptir. Margarinler, şorteningler, fırın ürünleri ve bitkisel ürünler gibi ürünlerde lipazla modifiye edilmiş tereyağı ürünleri aroma geliştirici olarak kullanılmaktadır. Lipazlar bakteri, maya ve küfleri içeren mikrobiyal flora tarafından bol miktarda üretilmektedir. Lipazlar gıda endüstrisinde, biyomedikal uygulamalarda, biyosensörler ve pestisitlerin yapımında, deterjan ve deri sanayiinde, çevre yönetiminde, kozmetik ve parfüm sanayiinde uygulama alanları bulmaktadır. Endüstriyel olarak en yaygın kullanılan lipaz üreticisi mikroorganizmalar; *Candida* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhizopus* sp.'dir. Son yıllarda biyoteknoloji alanında lipazların kullanımında hızlı bir artış gözlenmektedir. Bu nedenle lipazların aşırı üretimini sağlamak amacıyla yönlü mutasyonlar yardımıyla suş geliştirme çalışmalarına ağırlık verilmiştir.

Kıyafetlerimizi kirleten maddelerin başında proteinler, yağlar ve nişasta gelir. Bu lekeleri yüksek sıcaklıkta kimyasal deterjanlar yoluyla gidermek mümkünse de, enzimlerin kullanılması düşük sıcaklıkta ve daha az mekanik enerji ile istenen temizliği sağlar. Ayrıca çimen, kan, süt ve ter lekelerini çıkarmakta biyolojik olmayan deterjanlara göre çok daha etkilidir. Deterjanlarda kullanılan enzimlerden proteazlar yumurta, kan gibi lekelerdeki proteinleri parçalar; lipaz yağ lekelerini, amilaz ise nişasta bazlı lekeleri çıkartmakta etkilidir. Çamaşırların yıpranmasıyla oluşan selülöz fibriller ise, selülaz enzimi ile parçalanarak çamaşırların daha yumuşak olması ve renklerini koruması sağlanır (Hiol ve ark., 2000).

Lipaz enzimi dericilikte de kullanılan enzimlerden biridir. Bu enzim, yalnızca derinin yüzeyindeki değil, içindeki yağları da temizleyerek, deriyi tabaklama ve boyama gibi işlemler için daha uygun hale getirir. Deriler işlenirken bu amaçla bazı proteinler parçalanıp deriden uzaklaştırılır. Deriye ne derecede esneklik kazandırılacağı ise, derinin kullanılacağı alana bağlıdır. Lipaz enzimi, unda bulunan %1-2 civarındaki lipid (yağ) içeriğine etki etmektedir. Bu enzim içinde kullanım miktarı ve tipi oldukça önemlidir. Örneğin, yüksek miktarlarda kullanımda hamur özellikleri açısından sorunlar yaşanmasına neden olmaktadır. Öte yandan uygun lipaz tipinin seçilmesi de önemlidir. Türk ekmek üretim biçimine uygun olmayan

lipaz tipinin ekme k özelliklerine olumlu bir katkısı bulunmamaktadır. Unlara uygun lipaz tipinin ilavesi; hamurun işlenebilirliğinde kolaylık, hamur stabilitesinde artış, ekme k içi yumuşaklık, ekme k hacminde artış sağlar ( Eren Kıran ve ark.,2006).

Lipazlar, hem sulu hem de susuz solvent sistemlerinde aktivite gösterdikleri için endüstride ve tıp alanında önemli bir yere sahiptirler. Bu enzimlerin lipid içeren atık suların enzimatik değredasyonu, organik sentez, deterjan formülasyonu, biyos rfektanların sentezi, oleokimyasal endüstri, süt endüstrisi, agrokimyasal endüstri, kağıt yapımı, besin, kozmetik, kimyasal analiz ve ilaç prosesinde umut verici uygulama alanları bulunmaktadır. Lipaz teknolojisindeki gelişmelerle birlikte yeni bileşiklerin sentezi için de bu enzimlerin kullanımları hızla artmaktadır. Mikrobiyal lipazların, biyosensör olarak kullanılmaları ise yeni bir alan olarak  mit vaat etmektedir (Saraç ve ark,2008). Lipazlar, potansiyel biyokatalizör olarak kullanıldıkları daha bir çok alanda başarıyla görev almaktadırlar (Elibol ve ark., 2008).

Bu nedenle lipazlar günümüzde organik kimyacıların, eczacıların, biyofizik ilerin, biyokimya ve proses mühendislerinin, biyoteknologların, mikrobiyolog ve biyokimyacıların seçtikleri önemli bir cinstir.

#### **1.4. Bakteriyal Lipazlar**

Bakteriyel lipazların bir kısmı glikoprotein, bir kısım da lipoprotein yapısındadırlar. Winkler ve ark., (1979)  oğu bakteride enzim üretiminin bazı polisakkaritler tarafından etkilendiğini bildirmiştir. Őimdiye kadar çalışılan bakteriyel lipazların büyük bir kısmının basit yapılı, substratlarına karşı spesifik olmayan ve ancak çok azının sıcaklığa karşı kararlı oldukları bildirilmiştir (Saxena ve ark., 2003).

Bakteriyel lipaz  retiminde, *Achromobacter* sp., *Arthrobacter* sp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* sp. ve *Chromobacterium* sp. gibi mikroorganizmalardan faydalanılmaktadır. Stafilokokkal lipazlar doğada lipoprotein yapısında bulunurlar. *S. aureus* ve *S. hyicus*'tan saflaştırılan lipazlar yaklaşık olarak 34-46 kDa ağırlığındadırlar. Bu lipazlar, Ca<sup>++</sup> iyonu tarafından uyarılır ve EDTA tarafından inhibe edilirler. Optimum pH 7,5-9,0 arasında değişir. *S. hyicus* ve *S. aureus*'un lipaz genleri klonlanmış, sekans analizleri yapılmış ve diğer lipazlarla karşılaştırılmıştır. Farklı *Pseudomonas* türlerinden elde edilen lipazlar, süpernatant kültüründen asidifikasyonla, amonyum sülfat   kt rmesiyle, sefaroze CL-6B

kromatografisiyle ve CHAPS kullanılarak izoelektrik odaklama ile saflaştırılmıştır. *P.fragi*, *P. fluorescens* ve *P. aeruginosa* sırasıyla 33 kDa, 45 kDa ve 29 kDa ağırlığında olup monomerik yapıdadırlar. Lipazlar , Zn, Fe ve Al iyonları tarafından aktive edilir ve Ca iyonu tarafından inhibe edilir. *P. fragi*'nin lipaz geni klonlanmış ve sekans analizi yapılmıştır. (Saxena ve ark., 2003).

### 1.5.Pseudomonadaceae Familyası

Gram negatif çomak şeklinde bakteriler olup polar flagella vasıtasıyla hareket ederler. Kemoorganotrof ve aerobik bakterilerdir. Üremeleri 4 °C'den 43 °C'ye kadar geniş ısı ortamlarında olmaktadır. Organotrofik olan *Pseudomonas*' lar karbon ve enerji kaynağı olarak bir karbonlu organik bileşikleri kullanabilirler. DNA' nın G+C oranı % 58-71'dir. Pseudomonaceae familyası *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Frateria* ve *Zooglea* olmak üzere 4 cins ihtiva eder. Geçmişte birçok bakteri cinsi Pseudomonadaceae familyası içerisine yerleştirilmiştir. Kluver ve Niel, bu familyanın üç takım içinde 25' ten fazla cins içerdiğini ileri sürmüşlerdir. Bu fazla sayı, filogenetik kriterlerin incelenmesiyle zamanla azaltılmış ve “ Bergey' s Manuel of Systematic Bacteriology ” in sekizinci baskısında olduğu gibi cins sayısı 4 e indirilmiştir.

Familyanın karakteristik cinsi, çoğu gruplara fenotipik benzerlikleriyle gram negatif bakterilerin en kompleks gruplarından biri olan *Pseudomonas*'tır. Bu cinsin üyeleri pek çok basit organik bileşiklerin kullanıldığı basit besi yerlerinde üremeleriyle ayırt edilirler. Oksidaz reaksiyonu genellikle pozitif ve % G+C oranı ise 58-70 arasındadır. *Pseudomonas* cinsi düz veya nispeten eğri ve çubuk şeklinde olan ve 0,5-1,0 x 1,5-5,0 µm boyutlarında bakterilerdir. Çoğu türler sudanofilik inklüzyonlar şeklinde görülen karbon rezerv materyali olarak poli- β-hidroksibutiratı (PHB) biriktirirler. *Pseudomonas* ' lar kapsülle sarılı değildir. Hücreler gram negatif boyanır. Hareket bir veya birkaç polar flagella ile olur ve nadiren de hareketsizdirler. Bazı türlerde kısa dalgalı lateral flagella da bulunabilir. Oksijen, terminal elektron akseptörü olarak fonksiyon görürken ( aerobik), nitrat da bazı durumlarda üremenin anaerobik olarak oluşmasına yardımcı olmak için alternatif elektron akseptörü olarak işlev görebilir. Çoğu, asidik şartlar altında (pH 4-5) üreme göstermez. Çoğu türler organik büyüme faktörlerine ihtiyaç göstermezler. Bazı türler enerji kaynağı olarak H<sub>2</sub> veya CO<sub>2</sub> kullanabilen fakültatif kemolitotrofturlar. Doğada geniş bir şekilde yayılırlar. Bazı türler insan, bitki ve

hayvan için patojenlerdir. *Pseudomonas* cinsine ait bakteriler genellikle büyüklük ve şekilleri yönünden genel tanımlamadan farklıdır. *P. putida* 'nın hücreleri ovaldir. Bazı türler ( *P. vesicularis*, *P. pseudoflava*) glikojeni andıran bir polisakkarit biriktirirler. Glikojen, PHB den daha az göze çarptığından tanınmaları için izolasyon ve kimyasal karakterizasyonlara ihtiyaç duyarlar. Elektron mikroskobu çalışmaları *Pseudomonas*'ların hücre membranına ve gram-negatif bakterilerin tipik hücre duvarına sahip olduklarını göstermektedir.

Pigmentasyon, başlangıçta *Pseudomonas* cinsinin bir genetik karakteri olarak bilinirdi. Fakat daha sonraki çalışmalar cinsin birkaç pigment oluşturmayan tür ihtiva ettiğini ortaya koymuştur. Koloniler normal hücresel alt yapılardan dolayı bazı renkler gösterirler. *Pseudomonas*' ın en iyi bilinen çözünebilir pigmentleri piyoverdin ve piyosiyanindir. Piyosiyanın yapısı iyi bilinmesine karşın piyoverdinler sadece kısmi olarak karakterize edilmiştir. Floresant pigmentler, düşük demir içerikli besiyerlerinde bol miktarda elde edilebilirler (Üzümcü Z., 2009). Pigmentasyon bakteriler tarafından renkli koloni üretimi veya besiyeri yüzeyine pigment salgılanması olup pigment üreten *Pseudomonas* türlerinin ayırımında kullanılan önemli bir özelliktir (Keskin ve Ekmekçi,2003). *Pseudomonas*' lar tarafından üretilen pigmentlerin antibiyotik ve bakteriyosin özelliğine sahip olduğu belirtilmiştir (Vachee ve ark.,1997). Bakteriyel pigmentler sekonder metabolitlerden olup, optimum şartları çok değişken olmakla birlikte gelişme sıcaklığı, ortamı ve besiyeri içeriklerine bağlı olarak farklı renklerde oluştururlar (Kanner ve ark., 1978). Hassen ve ark. (1998), çalışmalarında kullandıkları *Pseudomonas* cinsine ait türlerin, çinko varlığında piyoverdin pigmentini daha fazla sentezlediklerini ve çinkonun pigment üretimini arttırdığını göstermişlerdir. *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida* ,*P. fluorescens*, *P. chlororaphis*, *P. syringae* gibi türler düşük demir içerikli besiyerlerinde bol miktarda fluoresans pigmentleri üretmektedirler (Gülcan S., 2006) .

*Pseudomonas*' ların birçok türü amonyum iyonları veya nitrat ile enerji veya karbon kaynağı olarak tek bir organik madde içeren çok basit mineral besiyerlerinde gelişebilmektedir (Baumann ve ark., 1972). Virülans faktörü olarak hemolizine sahip olan *Pseudomonas aeruginosa* suşları kanlı besiyerlerinde hemoliz oluştururlar. Glukoz ve bazı karbonhidratları oksidasyon yolu ile parçalayıp asit oluştururlar. Laktoz ve sukroza etki etmezler. İndol ve H<sub>2</sub>S oluşturmazlar. Metil kırmızısı ve Voges proskauer testleri negatiftir. Çoğunluğu aerobik olup bazı türleri

nitratı kullanarak anaerobik olarak gelişebilirler. Üreyi amonyak haline ya da amonyağı üreye çevirebilirler ve bunları azot kaynağı olarak kullanabilirler. Çoğu asidik ortamlarda gelişemezler. Oksidaz pozitif veya negatif olabilirler. Katalaz pozitif olup lizin ve ornitini dekarboksile etmezler. *Pseudomonas* türlerinin tek karbon kaynağı içeren basit besiyerlerinde gelişebilme yetenekleri karakterizasyon yapılması için temel oluşturmaktadır. Bu organik bileşiklerin sayı ve tiplerinin değiştirilmesi ile gelişmeyi sağlayan bileşikler tespit edilerek, sabit kimyasal içerikli besiyerlerine bu bileşiklerin ilavesi ile izole edilen türlerin tanımlanmasına önemli katkılar sağlanmıştır (Cowan ve ark.,1974).

*Pseudomonas* türlerinin çoğu antimikrobiyal ajanlara dirençlidirler. Birçok antimikrobiyal ajana karşı dirençli olmasına rağmen *Pseudomonas* enfeksiyonlarına karşı kullanılan antibiyotiklerde mevcuttur. En önemli gruplar aminoglikozidler, yarı sentetik penisilinler, üçüncü kuşak sefalosporinler, quinolonlar ve karbepenemlerdir ( Hancock and Speert 2000). *Pseudomonas*'lar antibiyotiklere, metallere, antibakteriyal ajanlara, bakteriofajlara, bakteriosinlere, fiziksel ajanlara karşı dirençlilik sağlayan ve farklı metabolik özellik kazandıran plazmidlerce taşınan genler bakımından oldukça zengindirler. Plazmitlerin bazıları gelişme şartlarında rol alırken bazıları çeşitli ajanlara (R plazmitleri) karşı dirençliliğe, bazıları daha önce kullanılmamış karbon kaynaklarını kullanabilme kapasitesine etki ederler (Bruins ve ark., 2003). Böylece bu cinsin üyelerine çok yönlü fayda sağlanmış olur. Son zamanlarda *Pseudomonas* cinsine ait birçok plazmit yapısı açıklanmıştır. En iyi bilineni bazı *Pseudomonas putida* suşlarında bulunan TOL adındaki katabolik plazmit olup toluen, ksilen ve benzer aromatik bileşikler varlığında gelişme yeteneğini kodlamaktadır (Silver, 1992).

Toluen genellikle organik bir çözücü gibi kullanılır ve her yerde mevcut havayı ve suyu kirleten kimyasal bir madde sayılır. Toluen, hücre membranlarında dağılımlarından dolayı ökaryotik ve prokaryotik organizmalar için toksiktir (Demir B.,2007). Mikroorganizmalar bilinmeyen yabancı maddelere karşı kolaylıkla uyum sağlayabilmelerine karşın ani olarak gerçekleştirilen ilavelerde adaptasyon çok kötü olmakta, mikroorganizmalar hemen hemen hiç adapte olmamaktadırlar. Ancak sürekli olarak ve eşit dozlarda verilmesi halinde adapte olma daha kolay sağlanabilmektedir (Samsunlu,1977).

Toluen'in metabolizmaları için özellikle ait olduğu nesildeki *Pseudomons* cinsi için birkaç metabolik yol tanımlanmıştır. *Pseudomonas putida* F1 sonradan 3-



metilkatekol değiştirilen cis-glikol'ün yerini tutan iki defa oksijen katılmış bir toluen yolu kullanır. *Pseudomonas putida*'nın toluen ve ksilen gibi toksik hidrokarbon gruplarına karşı toleransa sahip olduğu görölmüştür. *Pseudomonas putida* toprak veya suda serbest yaşayan türdür. Bu tür biyodegradasyon, karbon-azot vb. döngülerinde önemli rol oynarlar. Karbon kaynaklarını parçalayabildikleri için kirlilik gideriminde kullanılabilirler. Boyutları 0,5-1,0 µm 1,5-4,0 µm arasında değişir. Mezofilik olduklarından optimum üreme sıcaklığı 25-30 °C' dir. Gram negatif olup, sporsuz ve çubuk şeklinindedirler. Aerobik metabolizmalı, bir veya daha çok kamçıyla hareket edebilen ve geniş bir organik madde çeşitliliğinde büyüeyebilen canlılardır. Özellikle düşük moleköl ağırlıklı organik bileşikleri kullanabilirler. Üç büyük yapısal bileşenden oluşurlar. Bunlar; lipopolisakkarid, protein ve fosfolipitten oluşan dış zar, fosfolipit ve proteinden oluşan iç zar ve polisakkarit ile peptitlerin çapraz bağlı kompleksi olup hücre zarlarını çevreleyen peptidoglikan (PEG) tabakasıdır. Gram negatif bakterilerde ince bir tabaka halinde olan PEG tabakası, kimyasalların parçalanmasından organizmanın içyapısını korumaya yeteneklidir. *Pseudomonas putida* yapısal bu özellikleri sayesinde ağır metalleri biriktirme özelliğine sahiptir (Gültekin G.,2005).

*Pseudomonas putida* fırsatçı bir patojen olup, vücuda yerleşir ve insan immunitesinin zayıflamasıyla birlikte kendini belli eder (Öztoprak ve ark., 2008).

Yapılan bir çalışmada *Pseudomonas* suşlarının biyodegradasyon özelliklerinin plazmit DNA kaynaklı olduğu belirtilmiştir (Gülcan S.,2006). Yapılan bir çalışmada, tek karbon kaynağı olarak toluen kullanılarak izole edilen *Pseudomonas* sp. D8'in atık sudaki toluen varlığında benzen ve diğer aromatik bileşikleri degrade edebildiği gösterilmiştir (Chang ve ark., 1997). Benzer bir çalışmada petrol ile kirlenmiş alanlardan izole edilen *Pseudomonas* suşlarının karbon sayısı 5-8 olan alkanları, tolueni ve naftalini kullanabildiği gösterilmiştir (Whyte ve ark., 1997). Antartika'da jet uçaklarının yakıtıyla kirlenmiş alandan tolueni tek karbon kaynağı olarak kullanabilen *Pseudomonas putida* suşları izole edilmiştir (Farrell ve ark. 2003).

*Pseudomonas*' lar toprak su ve çürümekte olan organik maddelerde bulunan mikroorganizmalardır. Bu ortamlar dışında sulak alanlarda yetiştirilen tarım ürünlerinde, lağım çukurlarında tuvaletlerde, hastane ortamı ve hastanelerde kullanılan temizlik maddelerinde, solunum ve diyaliz cihazlarında hatta dezenfeksiyon solüsyonlarında bile bulunabilirler (Carson ve ark.,1973).

*Pseudomonas*' lar geniş bir yayılım gösterirler. Minimal besin varlığında 4-43 °C gibi geniş bir sıcaklık aralığında gelişebilirler. Cinsin birçok türünün gelişme gösterdiği optimum sıcaklık 30 °C 'dir. Türlerin tamamı nötral veya alkali pH aralığında (7.0-8.5) daha iyi gelişmektedir (Cowan ve ark., 1974).

#### **Mikroorganizma sayısı bakımından bakteriyel büyüme :**

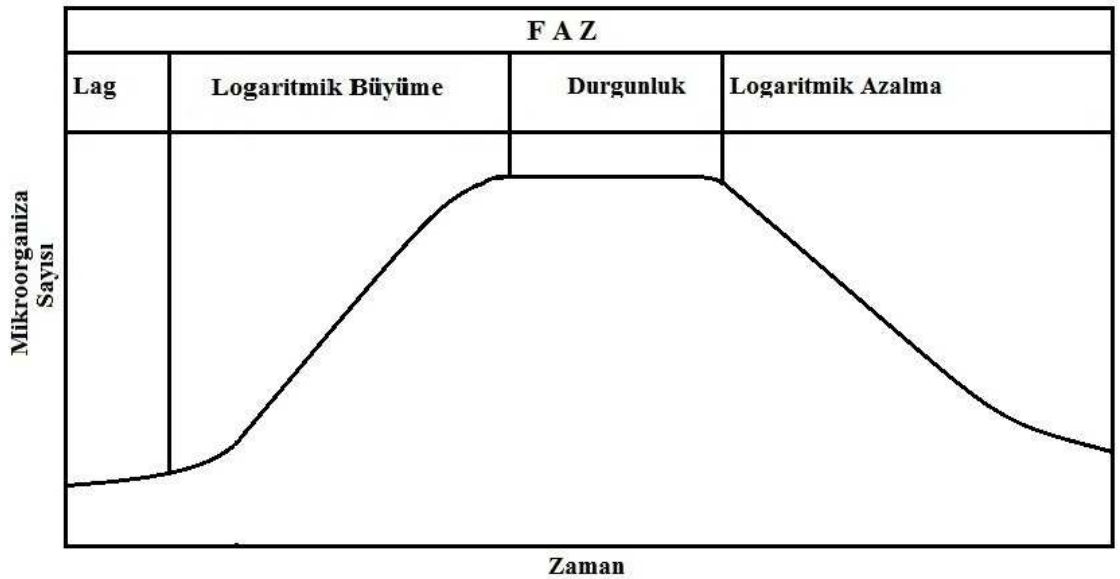
**1. Lag Fazı:** Bu faz bakterilerin yeni çevre şartlarına uyum sağlaması ve bölünmeye başlaması için gereken süreyi kapsar. Bu dönemde bakterinin üreme hızı sıfırdır. Bu dönemin süresi bakteri türüne, çevresel koşullara, besiyerinin bileşimine ve ekilen bakterinin ilk alındığı kültürün dönemine bağlıdır.

**2. Logaritmik Büyüme Fazı:** Mikroorganizmalar ortama alışmış olduğundan hücreler sabit oranda ve üs cinsinden (logaritmik olarak) çoğalmaya başlarlar. Bu fazda bakteriler henüz çevre şartları kısıtlayıcı bir duruma gelmediğinden bölünme sürelerine karşılık gelecek hızda büyürler.

**3. Durgunluk Fazı:** Bu fazda substrat ve nütrientlerin azalması nedeniyle yeni hücrelerin büyümesi ile eski hücrelerin ölmesi dengelendiğinden bakteri sayısı sabit kalır.

**4. Logaritmik Azalma Fazı (Ölüm Dönemi):** Bu fazda ölen bakteri sayısı yeni üretilen hücre sayısını aşar ve bakteri sayısı hızla azalmaya başlar.

Üremenin 4 fazının gerçekleştiği kültüre kesikli kültür adı verilir.



**Şekil 6: Mikroorganizma sayısı bakımından bakteriyel büyüme (Crites ve Tchobanoglous, 1998)**

## 2.MATERYAL- METOD

Bu çalışmada Anadolu Üniversitesi'nden getirilen *Pseudomonas putida* NRRL B-13 suşu kullanıldı. Bu bakterinin üretilmesinde kullanılan besiyeri bileşimi Tablo 1 de verilmiştir. Bu bileşenler hassas terazide (Gec Avery) tartılarak 250 ml lik erlene konuldu ve 250 ml distile su eklenerek miknatıslı karıştırıcı (Chiltern Hotplate) üzerinde sıvı besiyeri hazırlandı. Besiyerinin pH sı 1 M HCL ve 1 M NaOH kullanılarak pH 7' ye ayarlanarak erlenin ağzı pamuk tıkaç ve alüminyum folyo ile kapatıldı. Bu şekilde hazırlanan besiyeri otoklavda (Prior) 1.5 atm basınçta 110 °C' de 15 dakika steril edilerek ortam sıcaklığına kadar soğutuldu. Laminer flowda (Agus Lab) bek alevi yanında 4 °C' de benzoik asit çözeltisi içinde saklanan stok *Pseudomonas putida* bakterisinden; otoklav edilmiş besiyerine 5 ml bakteri ekimi yapılarak erlenin üzeri etiketlendi ve 37 °C' de ki etüve (Termal Lab) kaldırıldı. Besiyerleri 4 saat aralıklarla çalkalandı ve spektrofotometrede (Cecil Elegant Technology) 600 nm' de absorbans ölçümleri yapıldı. Durağan faza gelen bakterilerin absorbans değeri 0.530 olarak sabitlendi ve besiyeri 4°C' ye kaldırıldı. Erlenindeki besiyeri tüplere eşit miktarda dağıtılarak soğutmalı santrifüjde (Eppendorf Centrifuge 5415D) 10000 rpm' de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar pelletten ayrıldı ve yeni bir falkon tüpe konuldu. Bu süpernatant çalışmada durağan faz için lipaz enzim kaynağı olarak kullanılırken substrat olarakta p-nitrofenolbütirat kullanıldı.

Madde	Miktar (gr)
Yeast Ekstract( maya özütü)	1,25
Glukoz	3,75
Potasyum fosfat monobazik (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0,25

**Tablo 1. *Pseudomonas putida* NRRL B-13 suşunun çoğaltılmasında kullanılan sıvı besiyerinin bileşimi**

### **Tamponların hazırlanması:**

**1M, 100 ml Tris-HCl :**12,114 gr Tris tartılarak 80 ml distile suda çözüldü. 4,2 ml HCl asit eklenerek son hacim 100 ml ye tamamlandı ve tamponun pH sı 8,2 ye ayarlandı.

**10 ml,420 µM p-nitrofenolbütirat:** 200 mM olan stok p-nitrofenol bütirattan 21 µm alındı, üzeri 10 ml ye distile su ile tamamlanarak 420 µM p-nitrofenol bütirat hazırlandı.

### **p- nitrofenolbütirat 'ın en yüksek ışığı soğurduğu dalga boyu :**

p- nitrofenolbütirat 'ın en yüksek pik verdiği absorbansı bulmak için 25 µM p- nitrofenolbütirat solüsyonu spektrofotometrede dalga boyunu 10' ar 10'ar artırarak en yüksek pik verdiği değer belirlendi.

### **Durağan Faz 37 °C' de 410 nm Absorbans Ölçümü:**

Durağan fazda elde edilen enzim kaynağının aktivitesinin ölçülmesi için reaksiyon tüpü aşağıdaki gibi hazırlandı.

10ml, 420 µM p- nitrofenolbütirat (tüm çalışmalarda ışıktan hemen bozunduğu için alüminyum folyo ile kaplı olarak muhafaza edildi.)

10ml, 0,1 M Tris-HCl

10ml dH<sub>2</sub>O

37 °C' de etüvde 1 saat bekletildi.

10 ml' lik boş falkon tüp alüminyum folyo ile sarıldı ve 10ml, 420 µM p- nitrofenolbütirat tan 2,5 ml; 10ml, 0,1 M Tris-HCl' den 2,5 ml;10ml dH<sub>2</sub>O 'dan 1 ml bu falkon tüpe konuldu. 4°C' de saklanan enzim kaynağı süpernatanttan da 1 ml eklendi ve 5 dakika ara ile 410 nm' de spektrofotometrede ölçümler yapıldı.

### **37 °C' de Durağan Fazda Enzim Miktarı Artırılmış Absorbans Ölçümü**

Yukarıdaki deneyden farklı olarak durağan fazda elde edilen enzim kaynağının aktivitesinin ölçülmesi için reaksiyon tüpü aşağıdaki gibi hazırlandı ve tüpteki enzim miktarı 1,25 ml' ye çıkarıldı. Bunun için;

10ml, 420 µM p- nitrofenolbütirat

10ml, 0,1 M Tris-HCl

10ml dH<sub>2</sub>O

37 °C' de etüvde 1 saat bekletildi.

10 ml' lik boş falkon tüp alüminyum folyo ile sarılarak 10ml, 420 µM p- nitrofenolbütirattan 2,5 ml; 10ml, 0,1 M Tris-HCl' den 2,5 ml;10 ml dH<sub>2</sub>O 'dan 1 ml bu falkon tüpe konuldu. 4°C' de saklanan enzim kaynağı süpernatanttan da 1,25 ml eklendi ve 5 dakika ara ile 410 nm' de absorbans ölçümleri yapıldı.

37 °C de etüvde tutulan solüsyonlardan ayrıca aşağıdaki gibi kontrol tüpü oluşturuldu:

2,5 ml, 420 µM p- nitrofenolbütirat

2,5 ml, 0,1 M Tris-HCl

2.25 ml dH<sub>2</sub>O

ve 5 dakika ara ile 410 nm' de absorbans ölçümleri yapıldı.

### **37 °C' de Durağan Fazda Farklı Substrat Derişimlerinin Kullanılması**

Son hacimleri 10 ml olan 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ve 50 µM konsantrasyonlarında 10 tane farklı p- nitrofenolbütirat solüsyonu hazırlandı. Bu solüsyonlar 37 °C' de etüvde 1 saat bekletildi. Ayrıca 0,1 M Tris-HCl ve distile suda 37 °C' de etüvde 1 saat bekletildi. Her bir farklı substrat konsantrasyonu için farklı bir reaksiyon tüpü oluşturuldu ve her tüpe enzim (1 ml) eklendikten 5 dakika sonra 410 nm' de ve 273 nm' de absorbans ölçümleri yapıldı.

### **Standart eğri oluşturulması:**

Son hacimleri 10 ml olan 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ve 90 µM konsantrasyonlarında 10 farklı p- nitrofenolbütirat solüsyonu hazırlandı. Bu solüsyonlar 37 °C' de etüvde 1 saat bekletildi. Ayrıca 0,1 M Tris-HCl ve distile suda 37 °C' de etüvde 1 saat bekletildi. Her bir farklı substrat konsantrasyonu için farklı bir reaksiyon tüpü oluşturuldu ve her tüpe enzim yerine 1 ml 0,1 M Tris-HCl eklenerek 273 ve 410 nm' de absorbans ölçümleri yapıldı.

### **Logaritmik Faz Enzim Eldesi:**

Yukarıdaki Tablo1 de ki besiyeri bileşimi kullanılarak aynı şekilde besiyeri hazırlandı ve *Pseudomonas putida* NRRL B-13 suşundan; otoklav edilmiş besiyerine 5 ml bakteri ekimi yapıldı ve 37 °C deki etüve kaldırıldı. Besiyerleri 4 saat aralıklarla çalkalanarak 600 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri yapıldı. Logaritmik faza gelen bakterilerin absorbans değeri 0.450' ye ulaştığında besiyeri + 4°C' ye kaldırıldı. Erlendeki besiyeri tüplere eşit miktarda dağıtılarak soğutmalı santrifüjde 10000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar pelletten ayrılarak yeni bir tüpe konuldu ve süpernatant logaritmik faz için lipaz enzim kaynağı olarak kullanıldı.

### **37 °C' de Logaritmik Fazda Farklı Substrat Derişimlerinin Kullanılması**

5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 ve 60 µM konsantrasyonlarında 10 ml; 10 tane farklı p- nitrofenolbütirat solüsyonu hazırlandı. Bu solüsyonlar 37 °C' de etüvde 1 saat bekletildi. Ayrıca 0,1 M Tris-HCl ve distile suda 37 °C' de etüvde 1 saat bekletildi. Her bir farklı substrat konsantrasyonu için farklı bir reaksiyon tüpü oluşturuldu ve her tüp

enzim (1 ml) eklenildikten 5 dakika sonra 273 ve 410 nm' de absorbands ölçümleri yapıldı.

### **Logaritmik Fazda Farklı Sıcaklıklarda Absorbans Ölçümü:**

Logaritmik fazdaki elde edilen enzim kaynağının aktivitesinin ölçülmesi için reaksiyon tüpü aşağıdaki gibi hazırlandı.

10ml, 420  $\mu$ M p- nitrofenolbütirat

10ml, 0,1 M Tris-HCl

10ml dH<sub>2</sub>O

37 °C' de etüvde 1 saat bekletildi.

10 ml' lik boş falkon tüp alüminyum folyo ile sarılarak 10ml, 420  $\mu$ M p-nitrofenolbütirattan 2,5 ml; 10ml, 0,1 M Tris-HCl' den 2,5 ml; 10ml dH<sub>2</sub>O 'dan 1 ml bu falkon tüpe konuldu. 4°C' de saklanan enzim kaynağı süpernatanttan da 1 ml eklendi ve 5 dakika ara ile 410 nm' de absorbands ölçümleri yapıldı.

Aynı deney tüm şartlar aynı olmak koşuluyla sadece sıcaklık değiştirilerek 25 °C ve -20 °C' de yapıldı.

### **Logaritmik Fazda Farklı pH' larda (4-11) Absorbans Ölçümü:**

Diğer deneylerdeki tüm şartlar sabit tutularak sadece pH değiştirilerek 410 nm' de 5 dakika ara ile reaksiyon tüplerinin absorbands ölçümleri yapıldı.

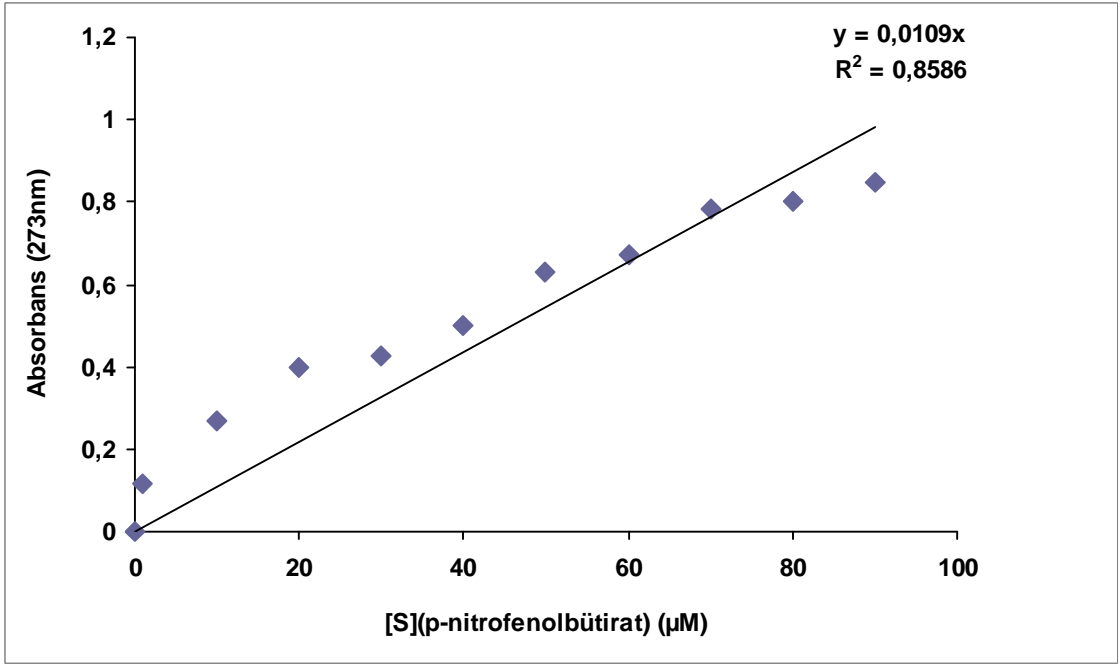
### **Logaritmik Fazda Kofaktör (MgCl<sub>2</sub>) Kullanımı**

Diğer deneylerdeki tüm şartlar sabit tutularak sadece reaksiyon tüpüne 0,01 milimolar 7  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> çözeltilisinden eklendi. 410 nm' de 5 dakika ara ile reaksiyon tüplerinin absorbands ölçümleri yapıldı.

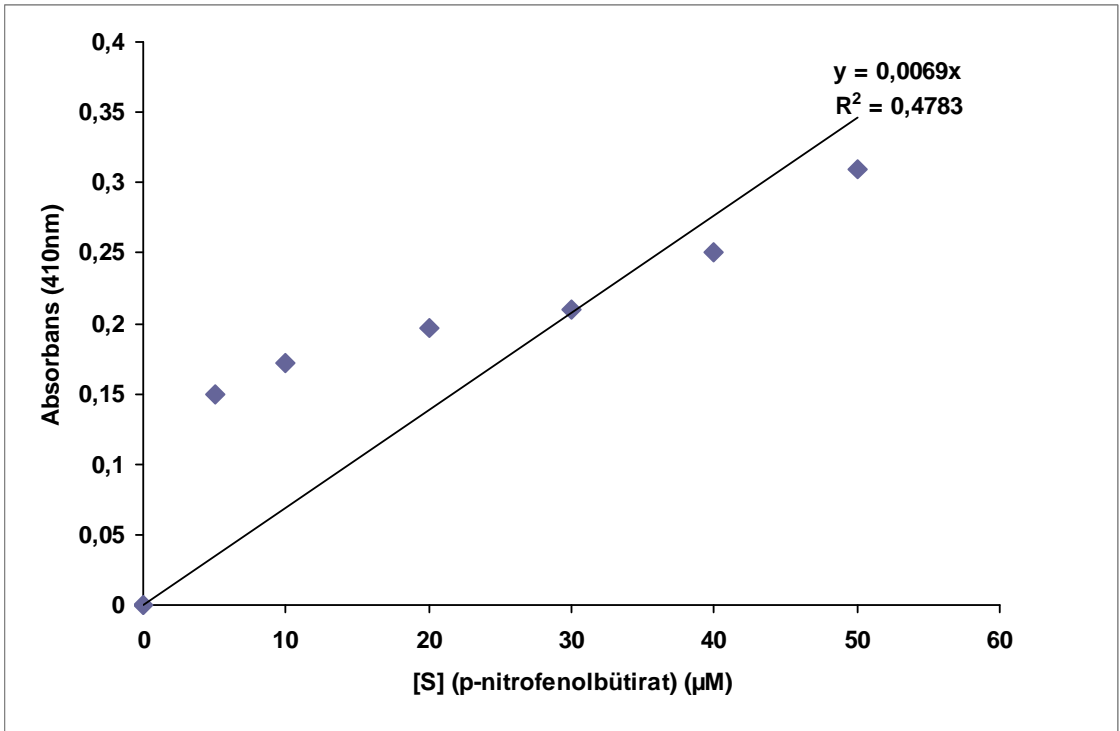
### **Logaritmik Fazda Kofaktör (CaSO<sub>4</sub>) Kullanımı**

Diğer deneylerdeki tüm şartlar sabit tutularak sadece reaksiyon tüpüne 0,01; 0,02 ve 0,04 milimolar çözeltilerinden farklı reaksiyon tüplerine 7 ml eklendi. Ayrıca içerisinde kofaktör bulunmayan kontrol grubu da oluşturularak absorbands ölçümleri 410 nm' de 5 dakika ara ile yapıldı.

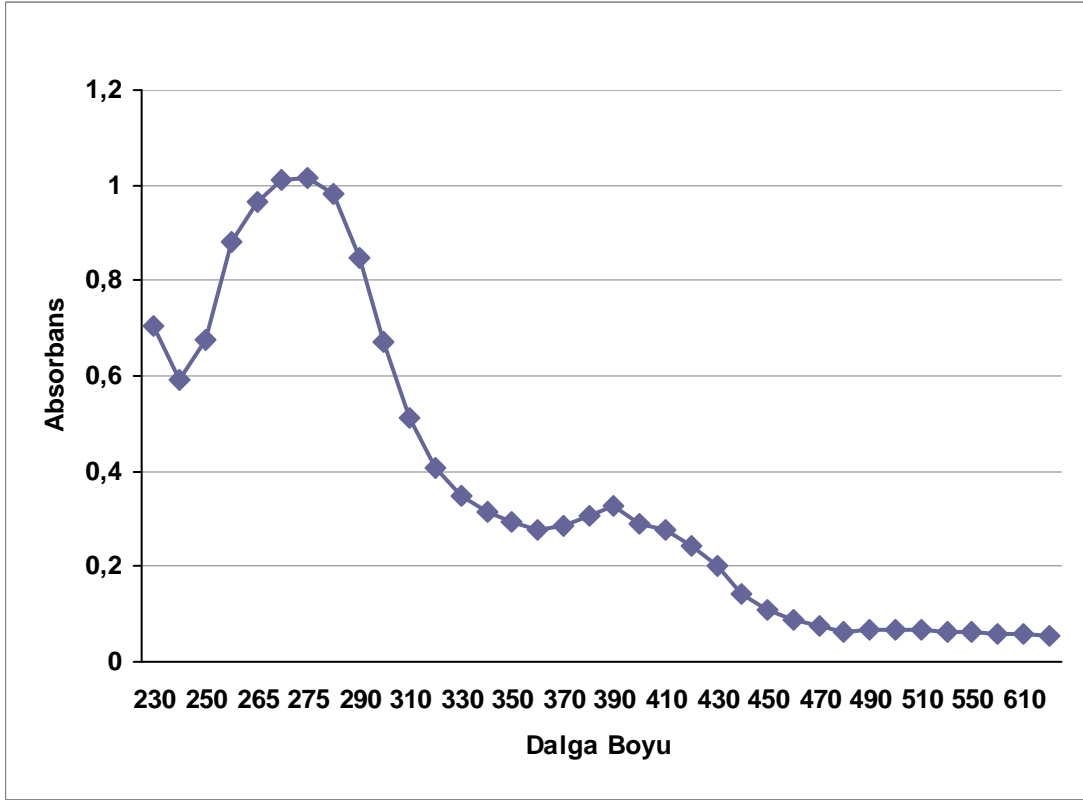
### 3.BULGULAR



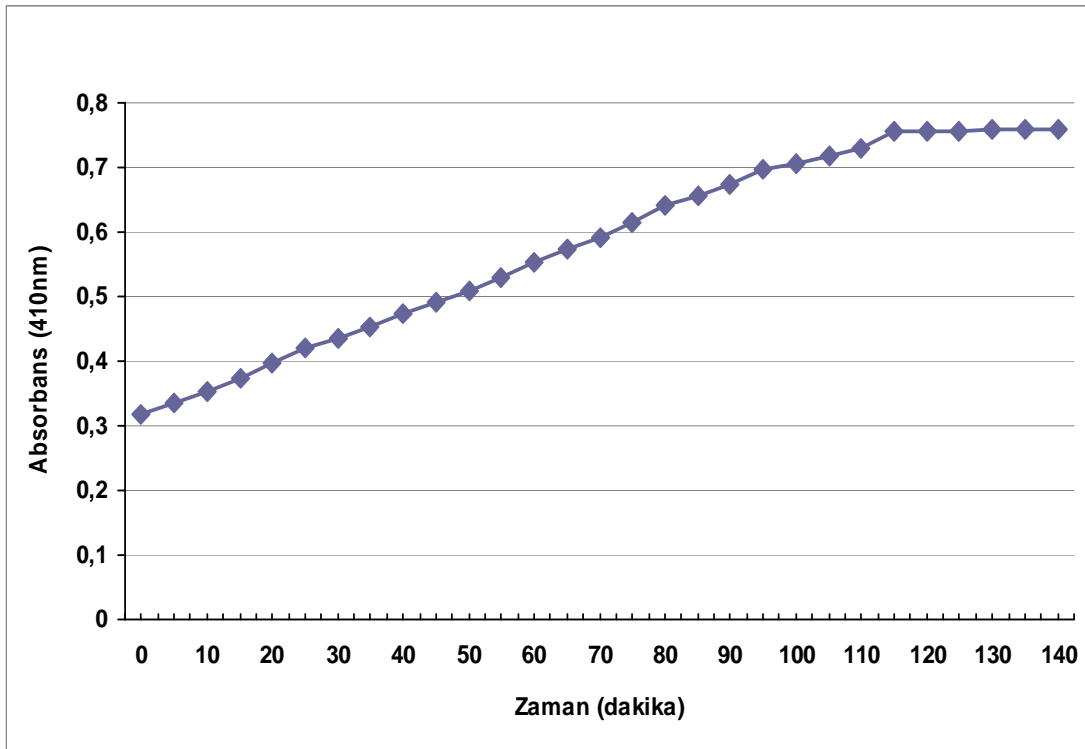
Şekil.3.1: 273 nm dalga boyundaki p- nitrofenolbütiratın standart eğrisi



Şekil.3.2: 410 nm dalga boyundaki p- nitrofenolbütiratın standart eğrisi

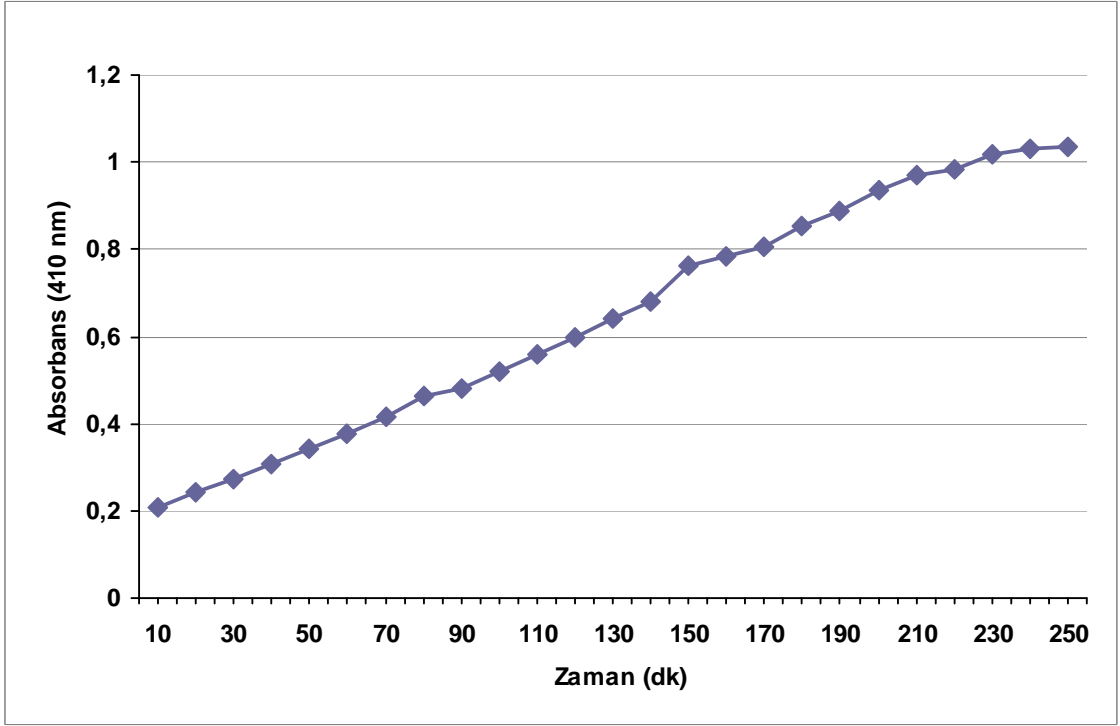


Şekil.3.3: Farklı dalga boylarında 25 µM p- nitrofenolbütirat ' ın absorbans değerleri

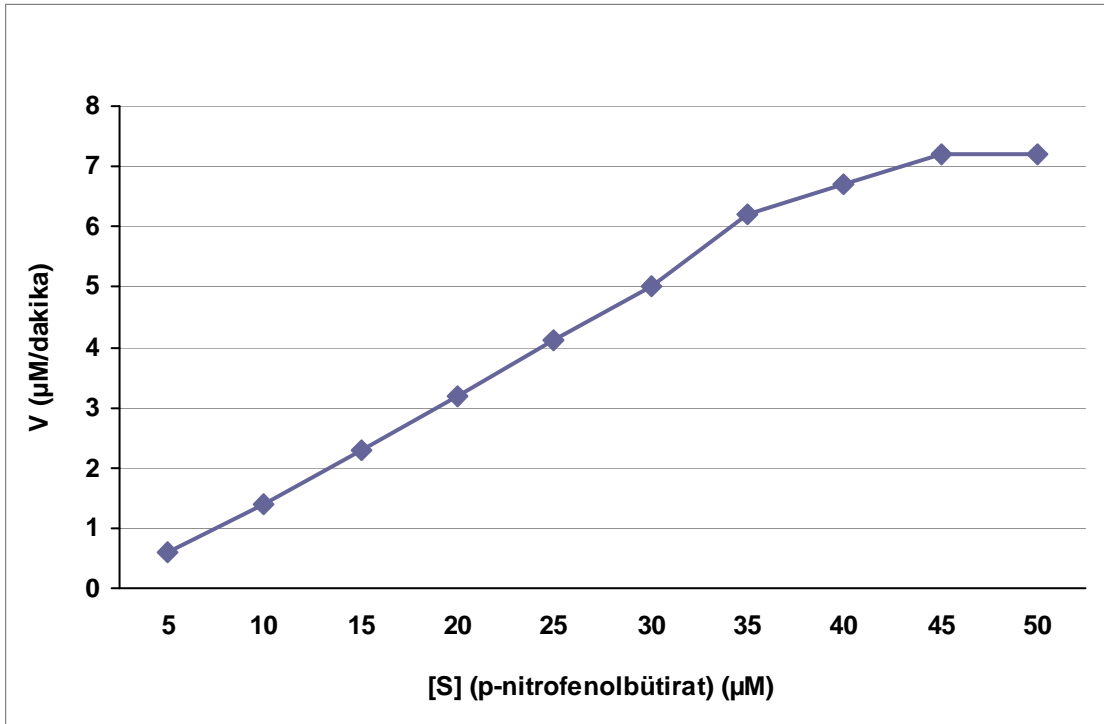


Şekil.3.4: Durağan Faz 37 °C' de Absorbans Ölçümü

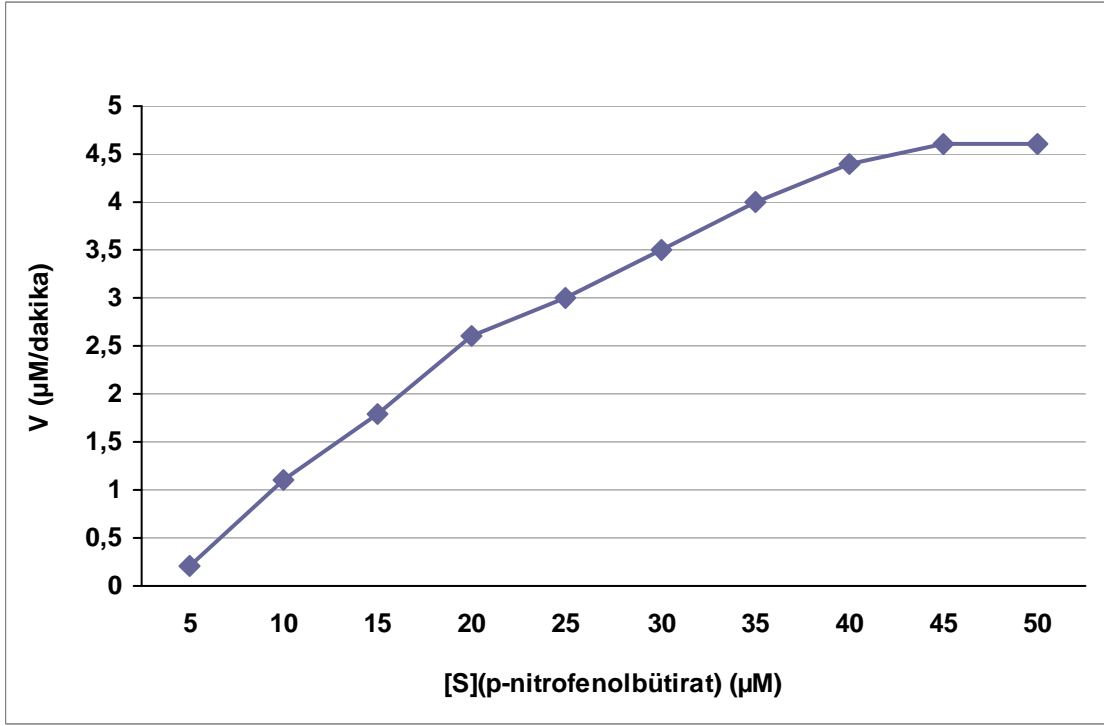




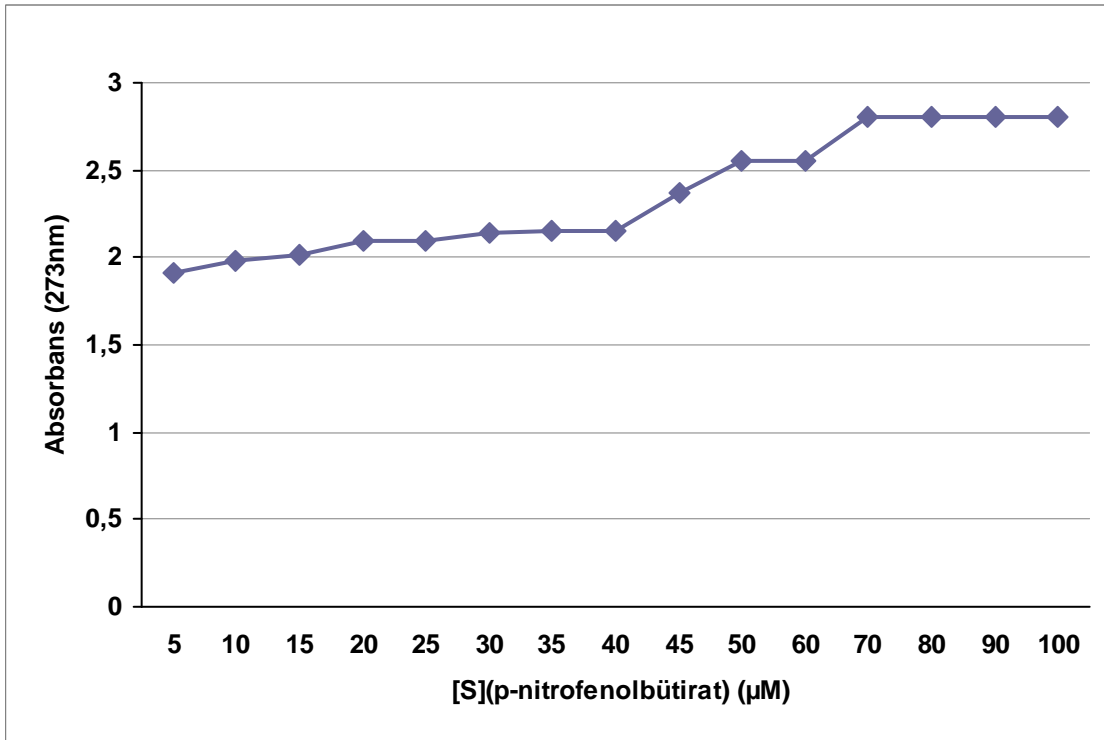
Şekil.3.5: Durağan Faz 37 °C' de Absorbans Ölçümü (Enzim miktarı artırıldı)



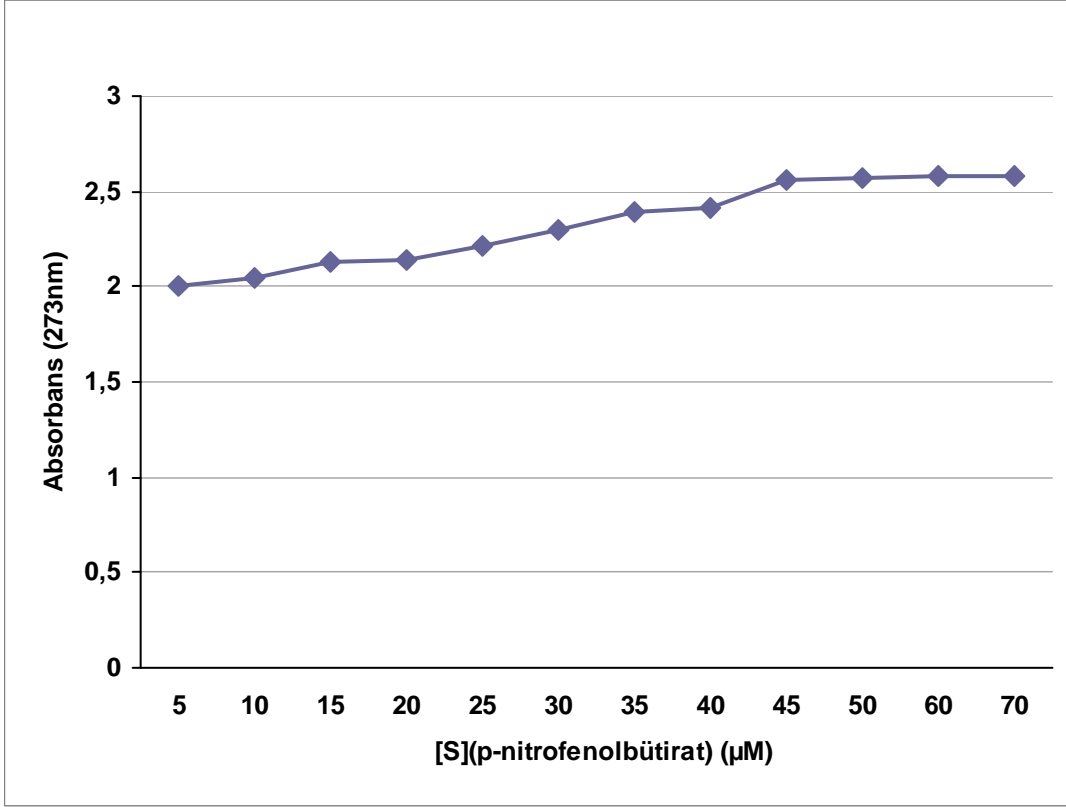
Şekil.3.6: Durağan Faz için Michealis-Menten grafiği



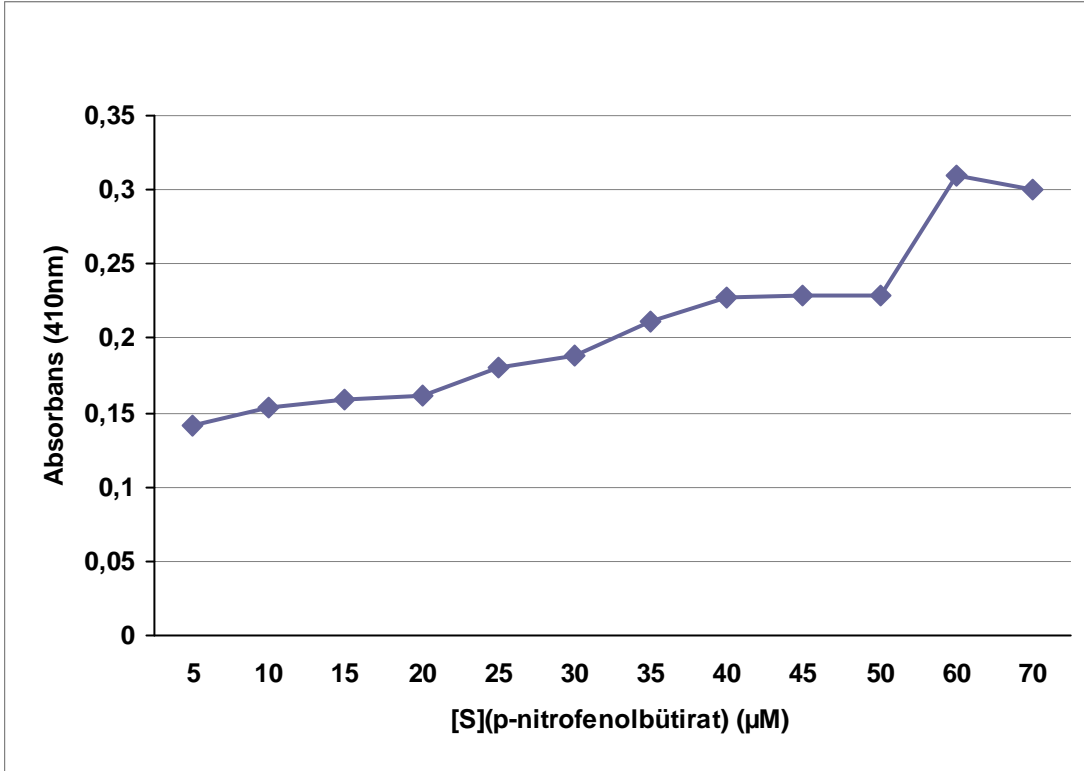
Şekil.3.7: Logaritmik Faz için Michealis-Menten grafiği



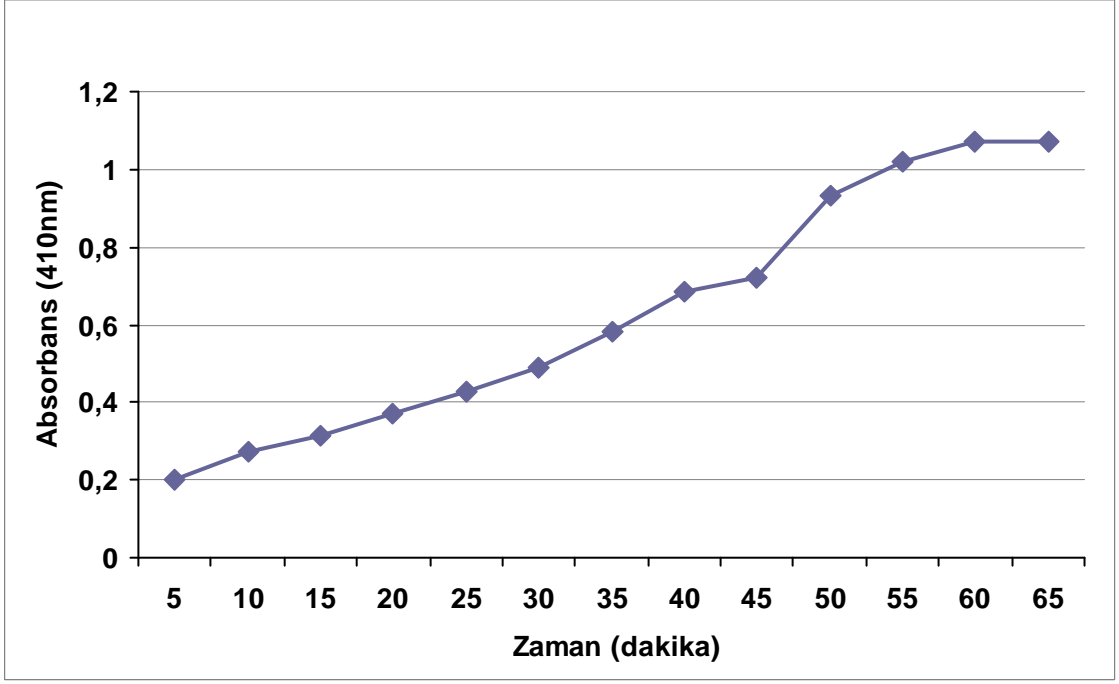
Şekil.3.8: Durağan faz 37 °C' de farklı substrat derişimleri ile absorbans ilişkisi



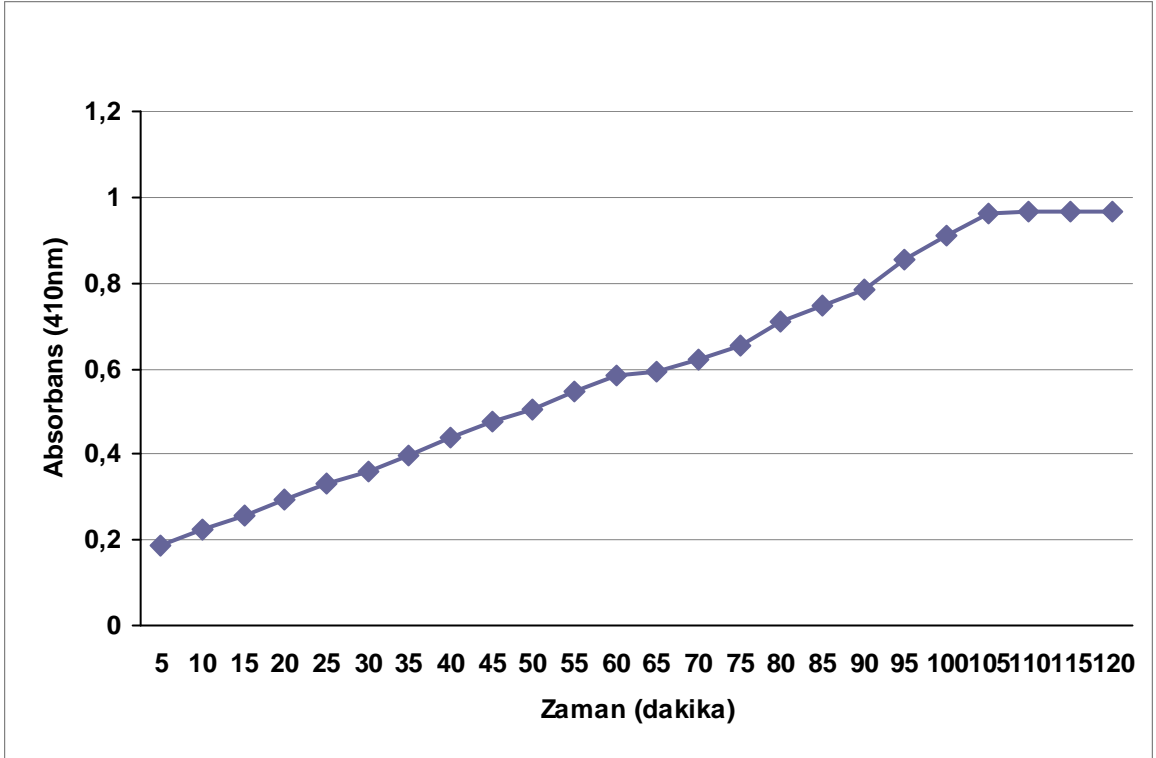
Şekil.3.9: Logaritmik fazın 37 °C' de farklı substrat derişimleri ile absorbans ilişkisi



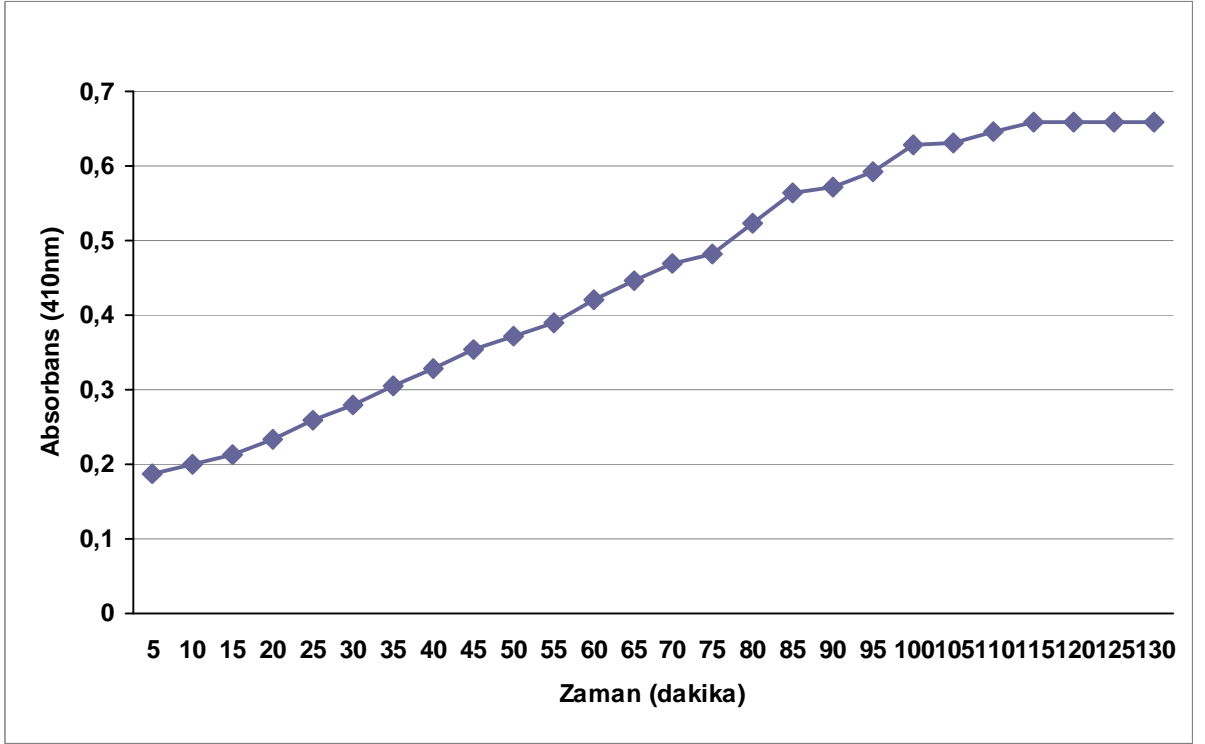
Şekil.3.10: Logaritmik fazın 37 °C' de farklı substrat derişimleri ile absorbans ilişkisi



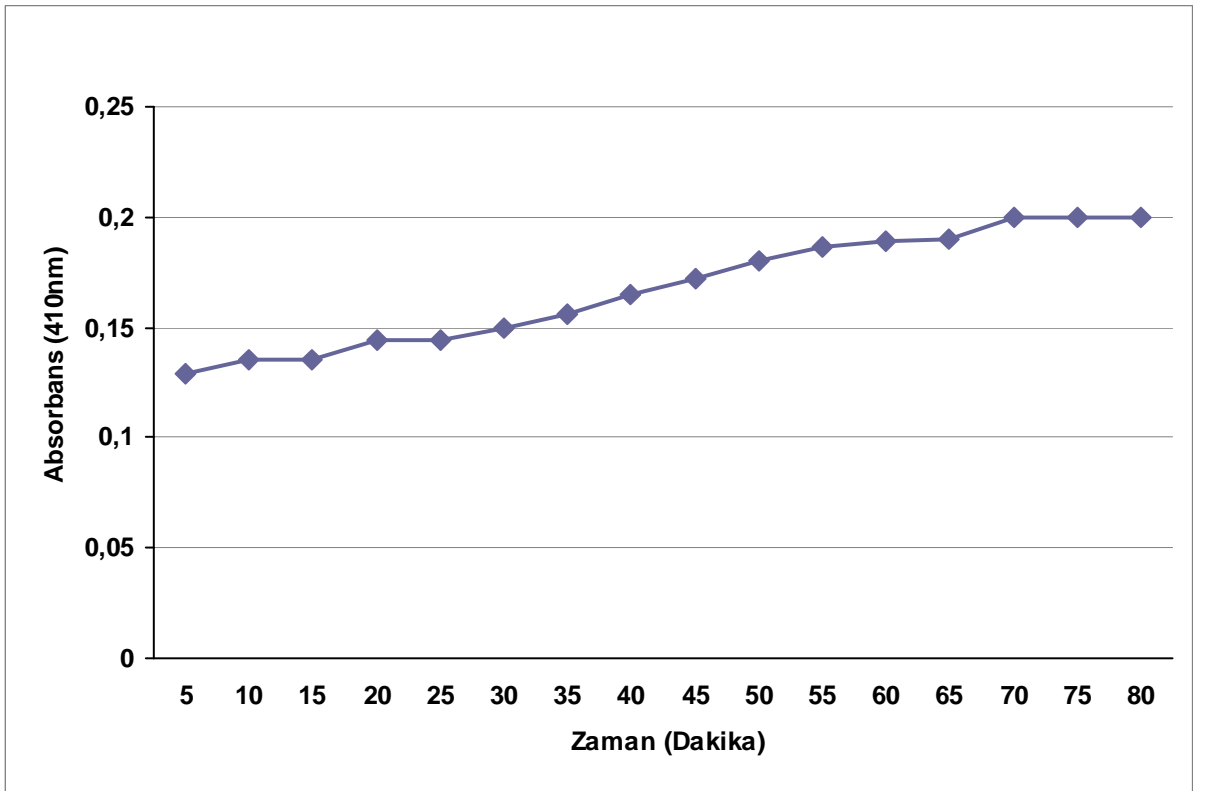
Şekil.3.11: Logaritmik Faz Sıcaklık Deneyi (37°C) Absorbans Ölçümü



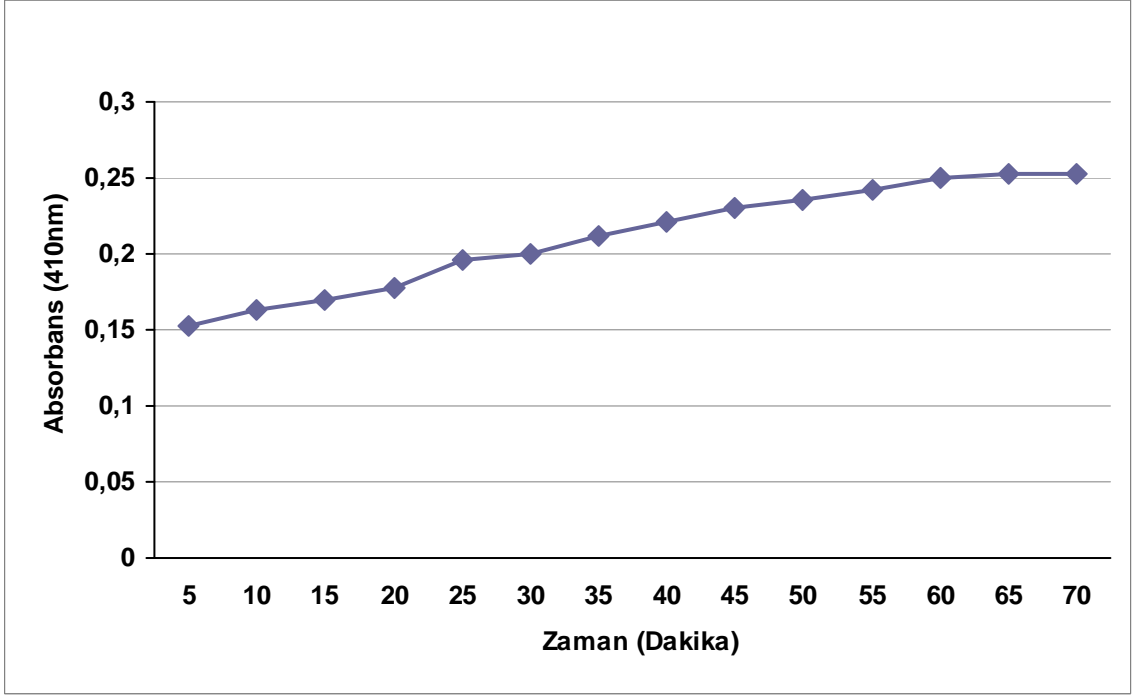
Şekil.3.12: Logaritmik Faz Sıcaklık Deneyi (oda sıcaklığı) Absorbans Ölçümü



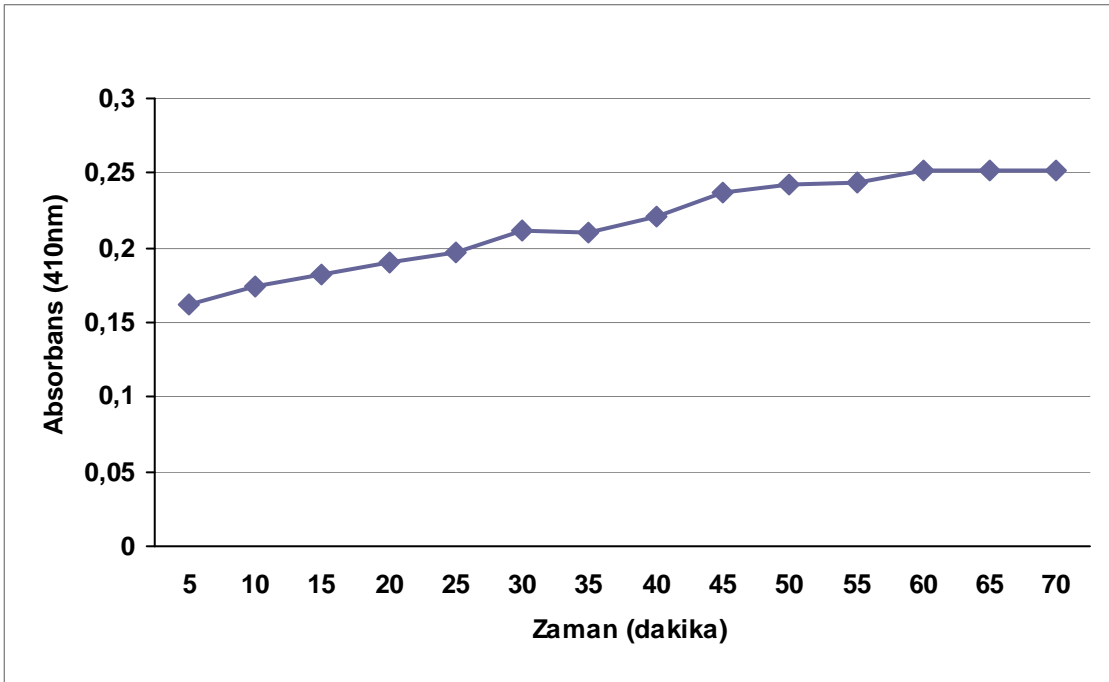
Şekil.3.13: Logaritmik Faz Sıcaklık Deneyi (-20°C) Absorbans Ölçümü



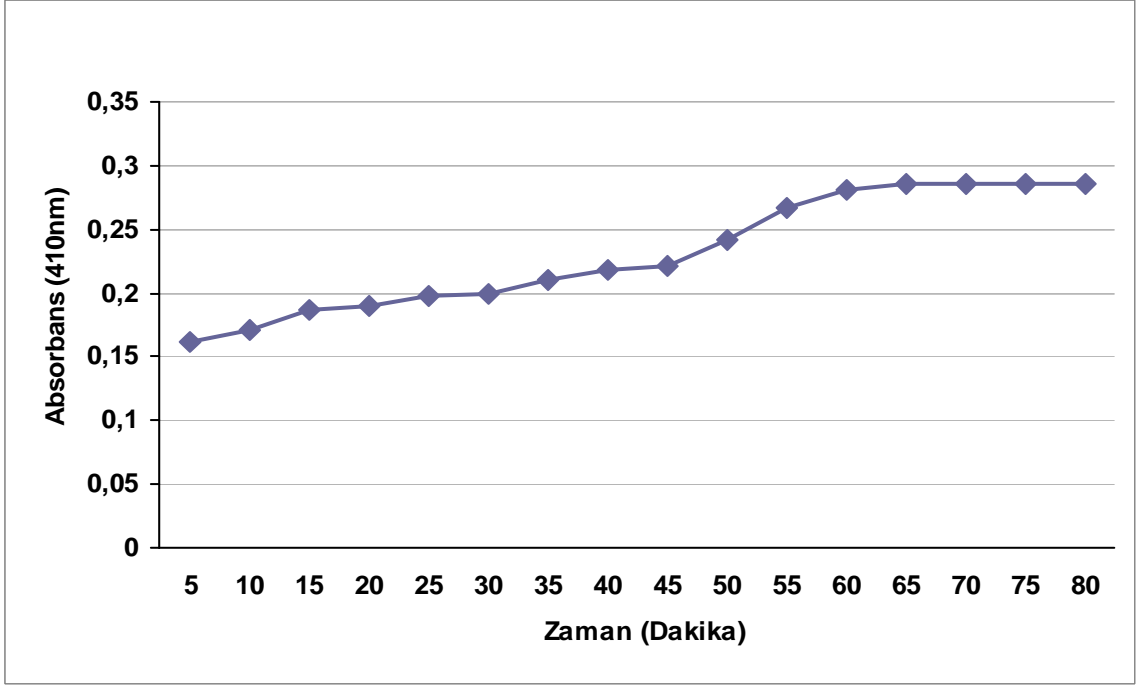
Şekil.3.14: Logaritmik fazın pH=4 zaman ile absorbans ilişkisi



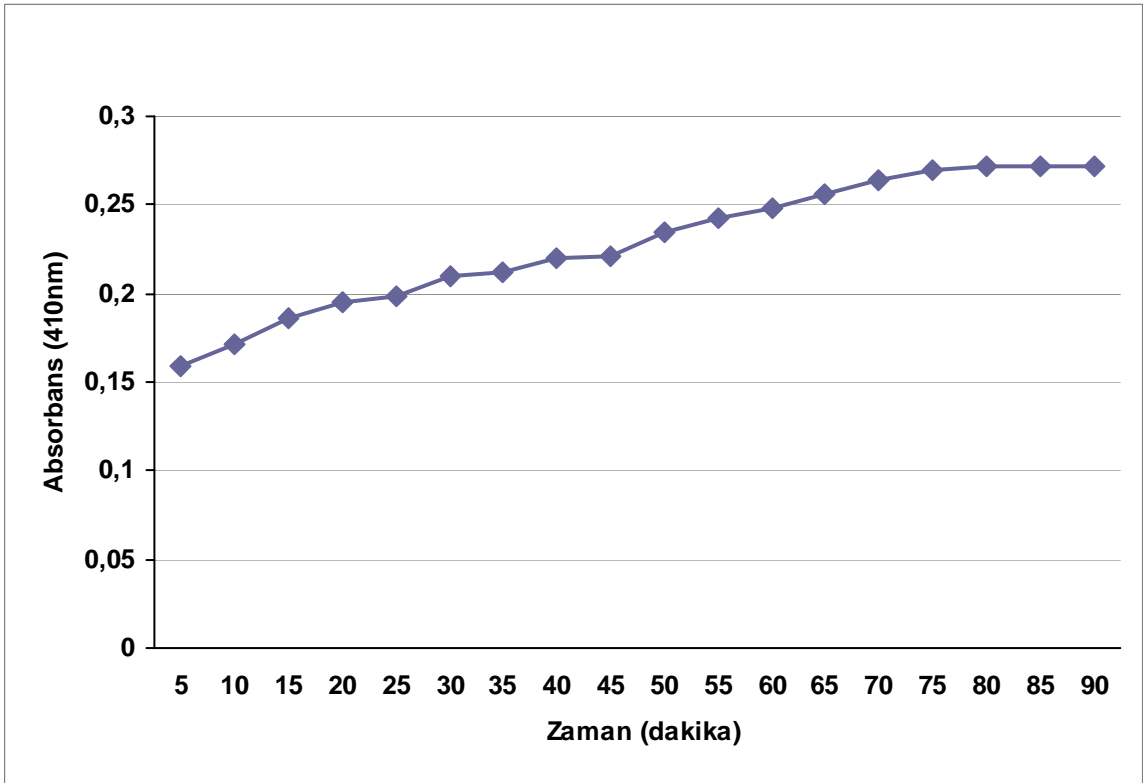
Şekil.3.15: Logaritmik fazın pH=5 zaman ile absorbans ilişkisi



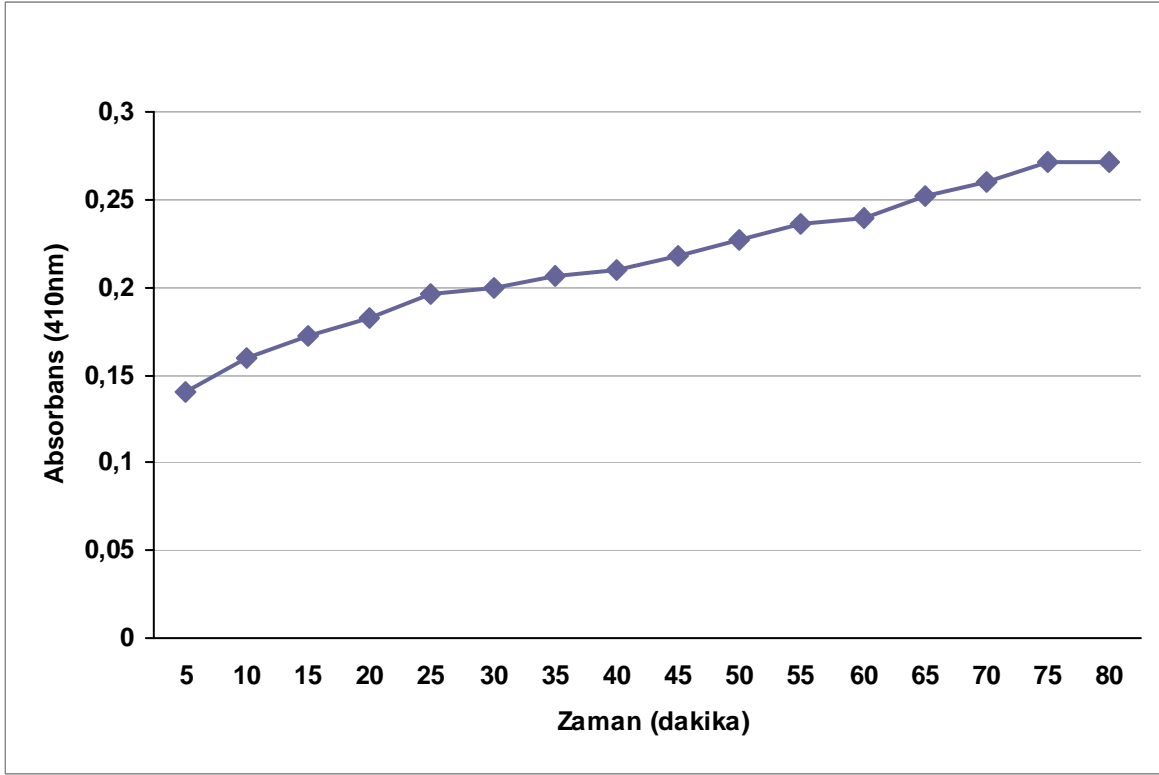
Şekil.3.16: Logaritmik fazın pH=6 zaman ile absorbans ilişkisi



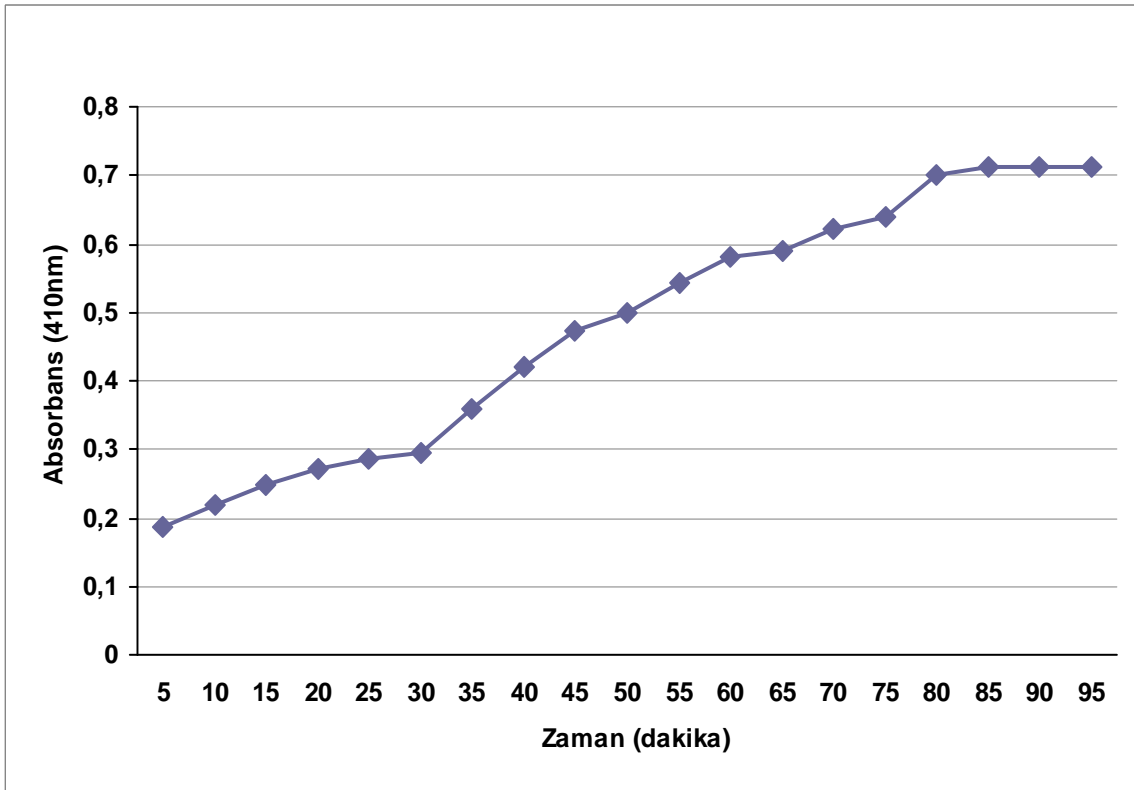
Şekil.3.17: Logaritmik fazın pH=8 zaman ile absorbans ilişkisi



Şekil.3.18: Logaritmik fazın pH=9 zaman ile absorbans ilişkisi

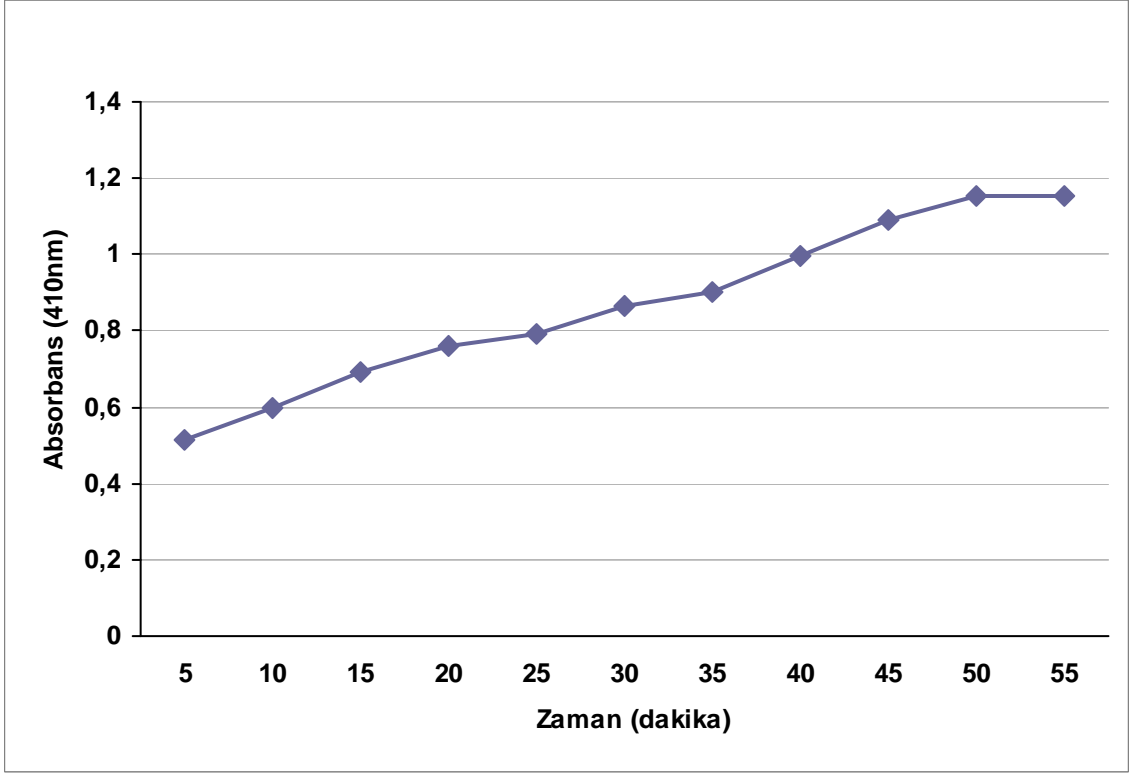


Şekil.3.19: Logaritmik fazın pH=10 zaman ile absorbans ilişkisi

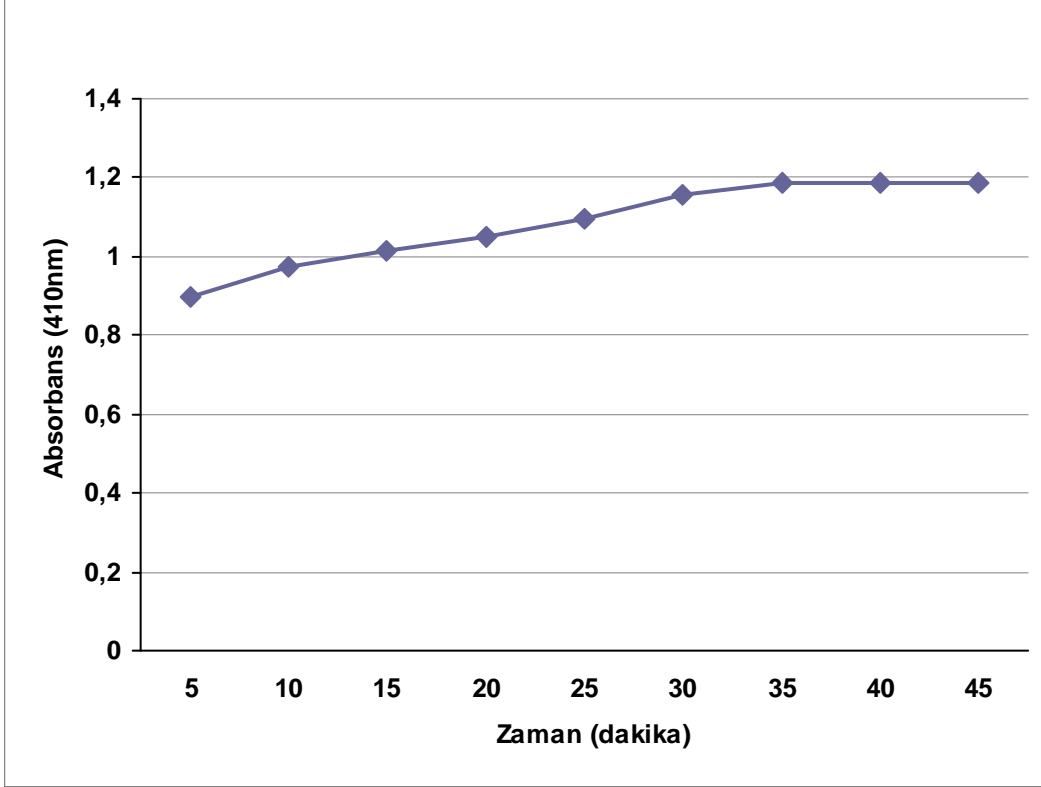


Şekil.3.20: Logaritmik faza MgCl<sub>2</sub> (0,01mM) eklenerek elde edilen zaman ile absorbans ilişkisi

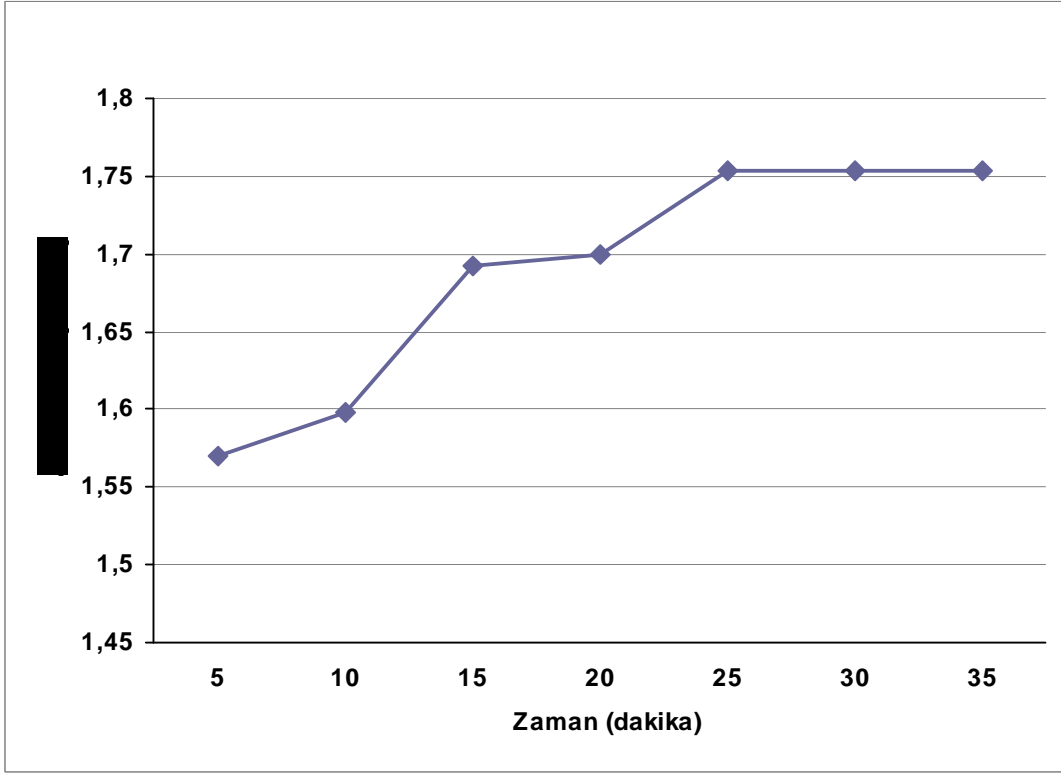




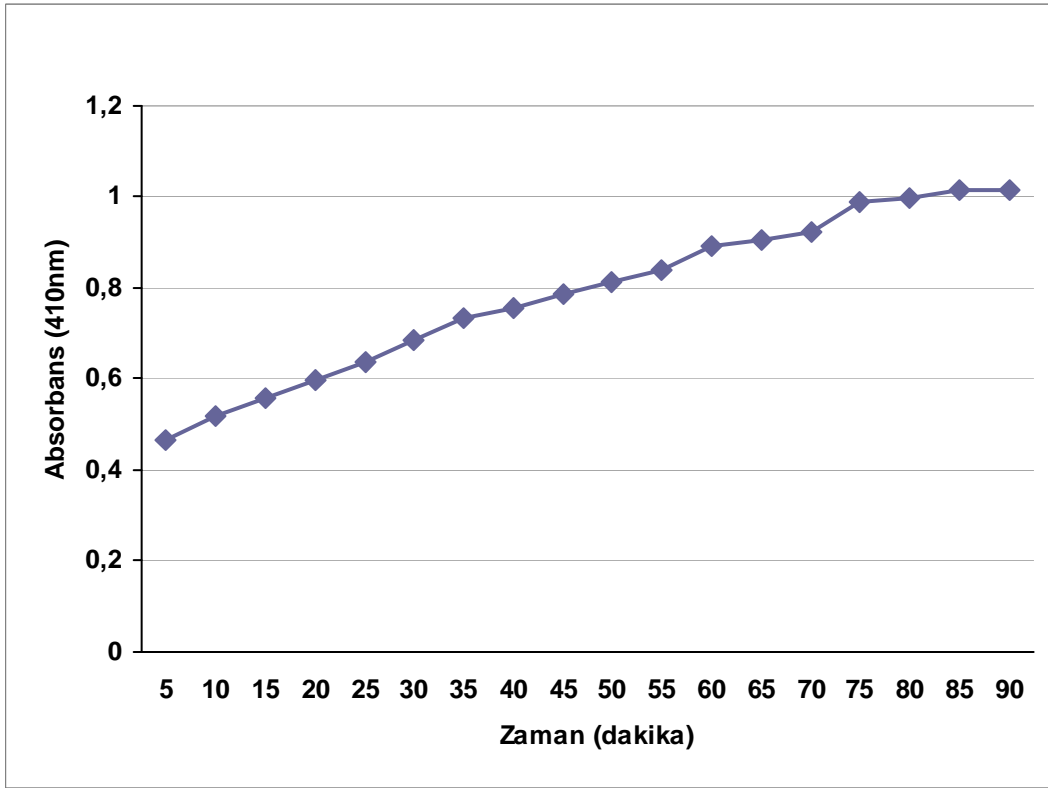
**Şekil.3.21:** Logaritmik faza  $\text{CaSO}_4$  (0,01mM) eklenerek elde edilen zaman ile absorbans ilişkisi



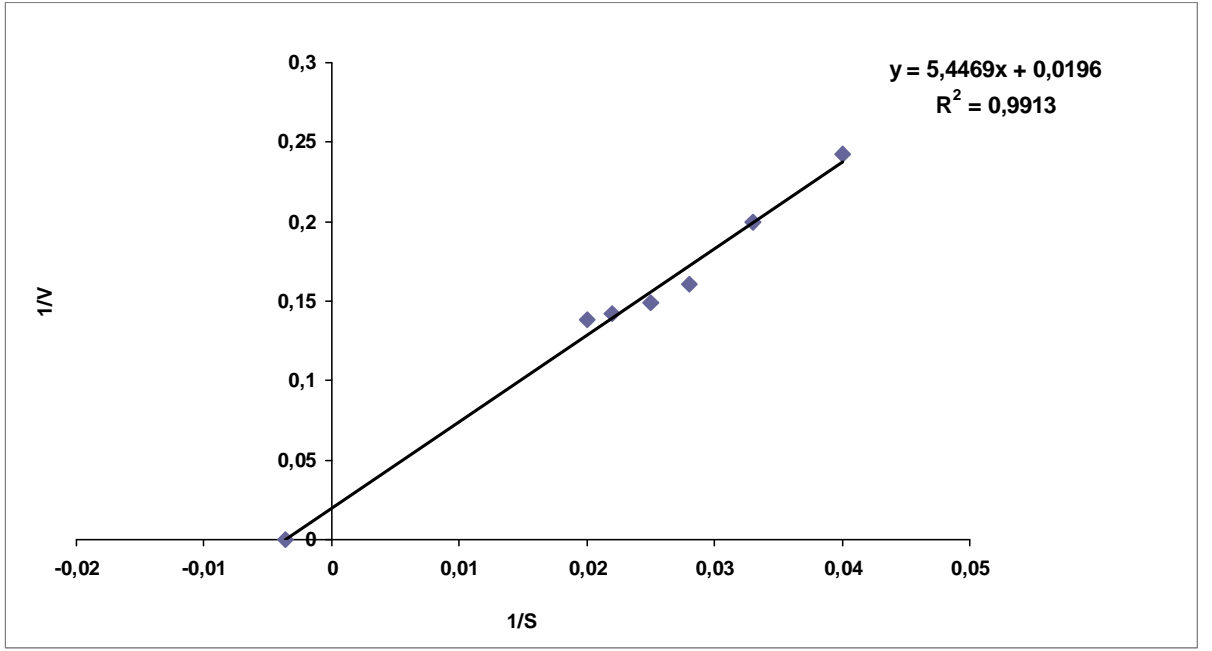
**Şekil.3.22:** Logaritmik faza  $\text{CaSO}_4$  (0,02mM) eklenerek elde edilen zaman ile absorbans ilişkisi



**Şekil.3.23:** Logaritmik faza  $\text{CaSO}_4$  (0,04mM) eklenerek elde edilen zaman ile absorbans ilişkisi



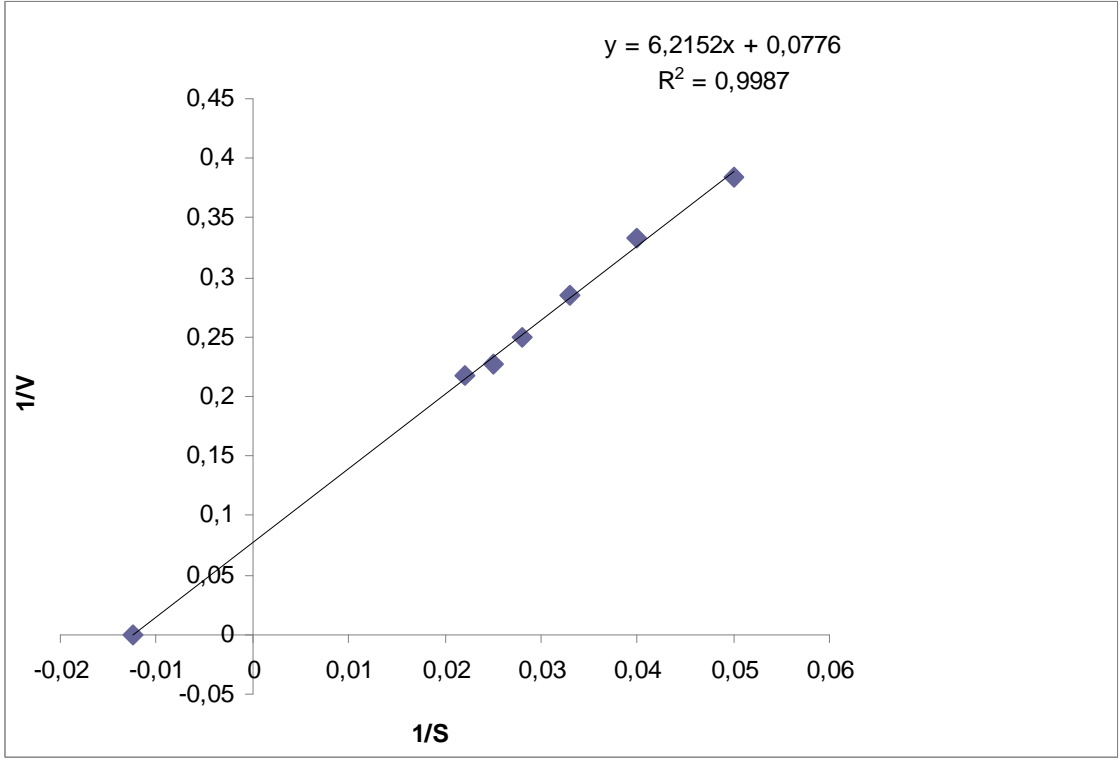
**Şekil.3.24:** Logaritmik Faz (kofaktör olmadan) Kontrol



Şekil.3.25: Durağan faz için Lineweaver- Burk eşitliği

$$- \frac{1}{K_m} = - 0,0036$$

$$K_m = 277,7 \mu M$$



**Şekil.3.26: Logaritmik faz için Lineweaver- Burk eşitliği**

$$-\frac{1}{K_m} = -0,01248$$

$$K_m = 80,12 \mu\text{M}$$

## SONUÇ-TARTIŞMA

Enzimler birçok biyokimyasal süreçte yer alıp moleküllerin parçalandığı tepkime basamaklarının yüzlercesini katalizler ve böylece kimyasal enerji korunur, dönüştürülür ve basit öncüllerden biyolojik makromoleküller üretilir ( Nelson ve Cox, 2005). Lipazlar suda çözünmeyen trigliseritleri, di ve mono-açilgliseridlere, serbest yağ asitlerine ve gliserole hidrolizini katalizleyen enzimlerdir (Saraç ve ark., 2008). Lipazlar ester bağlarına etki ettiği için, yağların ayrıştırılmasında, interesterifikasyonda (transesterifikasyon) peynirde farklı aromaların geliştirilmesinde, köpek maması yapımı için biftek yağının tadının değiştirilmesinde vs. kullanılmaktadır (Elibol ve ark., 2008). Lipazlar endüstriyel uygulamalar açısından önemli bir enzim grubudur. Bakterilerden özellikle Gram negatiflerle ilgili çok sayıda lipaz çalışması mevcuttur. Gram negatif bakterilerden *Pseudomonas* cinsi bakteriler iyi lipaz üreticisi olarak bilinirler. Gram pozitif bakterilerin özellikle *Bacillus* ve *Staphylococcus* cinsi bakteriler ile ilgili lipaz çalışmaları bilinmektedir (Saraç ve ark.,2008). Saraç ve arkadaşlarının yaptığı “Toprak ve Süt Kökenli Gram Pozitif Bakterilerde Lipaz Üretimi” adlı çalışmada kantitatif ekstraselüler lipaz aktivitesinin belirlenmesi için izolatların ekstraselüler lipaz aktiviteleri, *p*-nitrofenil palmitat’ın substrat olarak kullanıldığı spektrofotometrik yöntemle 410 nm dalga boyunda ölçüm yapılarak belirlenmiştir. Tributyrin ve Rhodamine-B Agar besiyerlerinde lipolitik aktiviteleri pozitif olarak belirlenen Gram pozitif bakterilerin ekstraselüler lipaz aktiviteleri *p*NPP’ın substrat olarak kullanıldığı spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. Bu ölçüm temel olarak *p*-nitrofenol esterlerinin enzimatik hidrolizi sonucunda meydana gelen *p*-nitrofenol’ ün 410 nm’de kolorimetrik olarak tespit edilmesine dayanmaktadır. Toprak ve süt izolatlarının lipaz aktiviteleri incelendiğinde her iki kökende de en yüksek lipaz aktivitesinin koagülaz negatif *Staphylococcus* sp.’de olduğu görülmektedir.

*Pseudomonas putida* NRRL B-13 suşunun ekstraselüler lipaz enzimleri aktivitesi durağan ve logaritmik fazlar için ayrı ayrı tespit edilerek aktivitenin hangi fazda yüksek olduğunu saptamak amacıyla yapılan çalışmada elde edilen süpernatantların ( enzim kaynağı) ilk önce 260 ve 280 nm’ de ayrı ayrı absorbansları ölçüldü. Deneylerde substrat olarak *p*- nitrofenol bütirat kullanılarak 410 nm ve 273 nm parametrelerinin her ikisi de kullanılmıştır. 410 nm’ de oluşan ürün absorbansı ölçülürken 273 nm’ de

substrat absorbansı ölçüldü. Bunun içinde substrat olarak kullanılan p- nitrofenol bütiratın en yüksek ışığı soğurduğu dalga boyu 273 nm olarak saptandı

Durağan faz ve logaritmik fazın 37° C' de 410 nm' de absorbans ölçümleri karşılaştırıldığında aktivitenin logaritmik fazda daha fazla olduğu görülmektedir. Aynı şartlar altında, aynı miktar enzim ve substrat varlığında logaritmik fazda substratın tamamen ürüne dönüşme süresi 65 dakika iken, durağan faz da bu süre 140 dakikadır. Birim zamanda ki artış miktarı da durağan faza göre daha yüksektir ( Şekil:3.4-Şekil:3.11).

Durağan fazın 37°C' de 410 nm' de absorbans ölçümleri enzim miktarı artırılarak (1,25ml) da çalışılmıştır. Burada gözlenen aktivite de aynı fazın enzim miktarı farklı (1ml) olan ürün absorbansları ile karşılaştırıldığında birim zamanda değişim olmadığı gözlemlenmiştir. Enzimle katalizlenen reaksiyonlarda substrat konsantrasyonu yüksek miktarda ise, reaksiyonun başlangıç hızı enzim konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak artmaktadır ve reaksiyon hızı belli bir değere ulaştığında sabitlenmektedir.

Farklı substrat derişimlerinde 410 nm ve 273 nm' de absorbans ölçümleri yapılarak standart eğri grafikleri oluşturuldu. Her iki faz için de farklı substrat derişimlerine bağlı olarak bu standart eğri üzerinden birim zamandaki hız miktarı hesaplandı ve Lineweaver- Burk eşitliği oluşturularak  $K_m$  değerleri hesaplandı.

Enzim maksimal hız ile çalışırken yüzeyine bağlı substrat konsantrasyonunun yarısına Michealis-Menten sabitesi adı verilir ve  $K_m$  ile gösterilir.  $K_m$  değeri enzim kinetikleri hakkında bilgi verir. Doğada bulunan enzimlerin  $K_m$  değeri optimal koşullarda 1 ile  $1 \times 10^{-6}$  M arasında değişmektedir. Bir enzimin  $K_m$  değeri onun substratına olan ilgisini göstermektedir. Enzimin substratına ilgisi fazla ise  $K_m$  değeri küçük, ilgisi az ise  $K_m$  değeri daha büyüktür. Durağan faz için hesaplanan  $K_m$  değeri 277,7  $\mu$ M bulunurken; logaritmik faz için hesaplanan  $K_m$  değeri 80,12  $\mu$ M bulunmuştur. Buna bağlı olarak logaritmik fazdan elde edilen enzimin substratına afinitesi daha fazladır çünkü  $K_m$  değeri daha düşüktür.

Enzimlerin aktivitesi sıcaklık ile direk ilişkili olup, sıcaklık yükseldikçe, enzimin katalize ettiği kimyasal reaksiyonun hızı da artar. Ancak, sıcaklık maksimal veya minimal limitlere yaklaşırsa, enzimin aktivitesinde yavaşlama ve sonunda durma meydana gelir. Logaritmik fazdan elde edilen enzim için farklı sıcaklık deneyleri yapıldı ve enzimin en iyi aktivite gösterdiği sıcaklık 37 °C olarak bulundu. -20 °C' de ve

oda sıcaklığında (25 °C’de) enzim beklenilenden çok daha düşük aktivite gösterdi, substratın ürüne dönüşme süresi de çok uzadı.

Her enzim için aktivitelerinin maksimum olduğu pH değerleri vardır. Bu değerlerin üzerinde ve altında aktivite düşer. Bununla beraber bütün enzimlerin pH–aktivite eğrileri aynı şekilde değildir (Bhat, 2000).Bakteriler genellikle pH 6-8 aralığında optimum üreme göstermektedirler, bu nedenle çalışmamızda optimum pH değerini belirlemek için önce pH 7’ de, sonra pH 4, pH 5, pH 6 ve pH 8, pH 9, pH 10 ‘ da çalışıldı. Logaritmik fazdan elde edilen enzim için farklı pH uygulamaları yapılarak enzimin en iyi hangi pH da aktivite gösterdiği saptandı. Tüm şartlar aynı tutularak sadece pH değiştirildi ve 410 nm’ de absorbans ölçümleri yapıldı. En iyi aktivitenin pH 7’ de olduğu gözlemlendi.

Ekstraselüler bakteriyal lipazların literatürde genelde kofaktör veya koenzime ihtiyaç duymadığına dair bir bilgi mevcuttur. Lipazlar serin hidrolazları sınıfı içinde yer alır ve bu nedenle hiçbir kofaktöre ihtiyaç duymazlar (Saxena ve ark., 2008). Saxena ve ark., (2003) lipazların , Zn, Fe ve Al iyonları tarafından aktive edilirken;  $Ca^{++}$  iyonu tarafından inhibe edildiğini bildirmiştir. Bakteriyel lipaz üretiminde, *Achromobacter* spp., *Arthrobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp. ve *Chromobacterium* spp. gibi mikroorganizmalardan faydalanılmaktadır. Stafilokokkal lipazlar doğada lipoprotein yapısında bulunurlar. Bu lipazlar,  $Ca^{++}$  iyonu tarafından uyarılır ve EDTA tarafından inhibe edilirler. Kofaktör olarak deneylerde  $MgCl_2$  ve  $CaSO_4$  kullanıldı.  $MgCl_2$  enzim aktivitesinde bir değişmeye neden olmazken,  $CaSO_4$  enzim aktivitesini çok yüksek miktarda artırdı 0,01 mM 0,02 ve 0,04 mM derişimlerinde 7 µl  $CaSO_4$  kullanıldı ve birim zamandaki aktivite en fazla 0,04 mM derişimdeki deneyde gözlemlendi. Burada  $Ca^{++}$  iyonu inhibe etmemiş aksine aktiviteyi çok yüksek oranda artırmıştır. *Pseudomonas putida* NRRL B-13 suşu da Stafilokokkal lipazlar gibi  $Ca^{++}$  iyonu tarafından uyarılmıştır.

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olmaları, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleridir (Wiseman,1987). Sonuç olarak lipazlar

endüstriyel alanda birçok alanda kullanılmaktadır. Özellikle süt ve peynir endüstrisinde, gıda endüstrisinde, biyomedikal uygulamalarda, biyosensörler ve pestisitlerin yapımında, deterjan ve deri sanayiinde, çevre yönetiminde, kozmetik ve parfüm sanayiinde uygulama alanları bulmaktadır. *Pseudomonas putida* NRRL B-13 suşunun üreme eğrisinde logaritmik faz tercih edildiğinde ve kofaktör olarak  $Ca^{++}$  iyonu kullanıldığında lipaz enzim aktivitesi çok yüksek olduğu için gelecekte bu suşun ticari bir enzim olarak kullanılması mümkündür.



## KAYNAKÇA

- Baumann, L., Baumann, P. Mandel, M. and Allen, R.D. (1972). Taxonomy of Aerobik Marine Eubacteria. *J. Bacteriol.*, 110(1): 402-429.
- Bhat, M.K. (2000). Cellulases and Related Enzymes in Biotechnology. *Biotechnology Advances* 18, 355-383
- Bruins, M.R., Kapil, S. and Oehme, F.W. (2003) Characterization of a Small Plasmid (pMBCP) from Bovine *P. pickettii* that Confers Cadmium Resistance. *Ecotox. Environ. Safe.*, 54: 241-248.
- Carson, L.A., Favero, M.S., Bond, W.W. and Petersen, N.J. (1973) Morphological, Biochemical and Growth Characteristics of *Pseudomonas cepacia* from Distilled Water. *Appl. Microbiol.*, 25(3): 476-483.
- Chang, B.V., W, W.B. and Yuan, S.Y. (1997) Biodegradation of Benzene, Toluene and Other Aromatic Compounds by *Pseudomonas* sp. D8. *Chemosphere.*, 35(12): 2807-2815.
- Cowan, S.T., Holt, J.G., Liston, J., Murray, R.G.E., Niven, C.F., Ravin, A.W. and Stanier, R.Y. (1974) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. (co-eds.), 8th ed., *The Williams and Wilkins Company.*, Baltimore, London, Part 7, p217-243.
- Crites ve Tchobanoglous, (1998), *Small and Decentralized Wastewater Management Systems*, McGraw-Hill, USA.
- Demain, A.L., and Solomon, N.A. (1981). In *Industrial Microbiology and the Advent of Genetic Engineering*, s. 3-14. Scientific American, Freeman &Comp., San Francisco.
- Demir, B. (2007). Kahramanmaraş İlinden Toplanan Toprak Örneklerinden Organik Solvent Tolere Edebilen Mikroorganizmaların İzolasyonu ve Tanımlanması, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.
- Elibol, M., Yaşa, İ., Karaçancı, Ş., Çoban, I. ve Özsoy, G. (2008). Zeytinyağı İşletmeleri Katı (Pirina) ve Sıvı (Karasu) Atıklarından Mikrobiyal Lipaz Üretimi, İzmir
- Eren Kiran, Ö., Çömlekçioğlu, U. Ve Dostbil, N. (2006). Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları, KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi, 9(1), 2006 KSU. *Journal of Science and Engineering* 9(1).

Farrell, R.L., Rhodes, P.L. and Aislabie, J. (2003) Toluene-Degrading Antarctic *Pseudomonas* Strains from Fuel-Contaminated Soil. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 312: 235-240.

Gessesse, A. (1998). Purification and Properties of Two Thermostable Alkaline Xylanases From an Alkaliphilic *Bacillus* sp. *Applied and Environmental Microbiology* . s. 3533-3535

Gülcan, S. (2006). Çeşitli Kaynaklardan İzole Edilen *Pseudomonas* Cinsi Bakterilerin Ağır Metal ve Naftalin Toleransı, Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli

Gültekin, G. (2005). Kadmiyum ve Bakır İyon Karışımlarını İçeren Atık Suların *Pseudomonas putida* 'ya Biyoakümülyasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.

Gözükara, E.M. (1994). *Biyokimya* 2 s. 572-591

Hancock, R.E.W. and Speert, D.P. (2000) Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Mechanisms and Impact on Treatment. *Drug Resist. Update.*, 3: 247-255.

Hassen, A., Saidi, N., Cherif, M. and Boudabous, A. (1998). Effects of Heavy Metals on *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus thuringiensis*. *Bioresource Technology.*, 65: 73-82.

Hiol, A., Jonzo, M. D., Rugani, N., Druet, D., Sadra, L., Comeau, L.C. (2000). Purification and Characterization of an Extracellular Lipase from Thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from Palm Fruit. *Enzyme and Microbial Technology.* 26, 421-430.

John, W. ve Sons, I. (1998). *Industrial Enzymes and Their Applications*. United States of Amerika. 454p.

Kanner, D., Gerber, N.N. and Bartha, R. (1978). Pattern of Phenazine Pigment Production by a Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 134(2): 690-692.

Keskin, D. ve Ekmekçi, S. (2003). *Pseudomonas* Türlerinin Gıdalardan İzolasyon ve Tanımlanmasında Kullanılan Besiyerleri, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, Cilt: 01 Sayı: 08 Sayfa: 29-33

Kindle, K.L. (1983). Characterization and Production of thermostable  $\alpha$ -Amylase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 8,153.

Madsen, G.B., Norman, B.E., and Slott, S., 1973. A New Heat-Stable Bacterial Amylase and its Use In High-Temperature Liquefaction. *Starke* 25, 304.

Nelson, L.D. ve Cox, M.M. (2005). *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri* s. 243-261

Niehaus, F., Bertoldo, C., Kahler, M., Antranikian, G. (1999). Extremophiles As a Source of Novel Enzymes For Industrial Application. *Appl Microbiol Biotechnol.* 51: 711-729.

Öztoprak, N., Çelebi, G., Bayar, A., Beğendik, F., (2008). Travma Sonrasında *Pseudomonas putida*'nın Etkin Olduğu Tibial Osteomyelit. Posttraumatic tibial osteomyelitis caused by *Pseudomonas putida*. *Joint Dis Rel Surg.* 19(1):41-44.

Samsunlu, A. (1977). Türkiye Bilimsel Ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK), VI. Bilim Kongresi Tebliğleri Çevre Araştırmaları Grubu

Saxena, R.K., Ghosh, P.K., Gupta, R., Davidson, S.W., Bradoo, S., Gulati, R. (2008). Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry, *Current Science Online*, 95(2)

Saxena, R.K., Sheoran, A., Giri, B., Davidson, S.W. (2003). Purification strategies for microbial lipases, *Journal of Microbiological Methods*, 52, 1-18.

Saraç, N., Boran, R., Ökmen, G. Ve Uğur, A. (2008). Toprak ve Süt Kökenli Gram Pozitif Bakterilerde Lipaz Üretimi. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi* 1 (2): 23-28

Silver, S. (1992) Plasmid-Determined Metal Resistance Mechanisms: Range and Overview. *Plasmid.*, 27: 1-3.

Topal, S., Pembeci, C. Borcaklı, M. (2000). Türkiye'nin Tarımsal Mikoflorasının Endüstriyel Öneme Sahip Bazı Enzimatik Aktivitelerinin İncelenmesi-I: Amilaz, Proteaz, Lipaz. *Turk J Biol* 24 (2000) 79-93, TÜBİTAK

Üzümcü, Z. (2009). *Pseudomonas* sp. Suşlarında Cold Shock Protein İzolasyonu ve SDS- PAGE Analizi, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana

Vachee, A., Mossel, D.A.A. and Leclerc, H. (1997). Antimicrobial Activity Among *Pseudomonas* and Related Strains of Mineral Water Origin. *J. Appl. Microbiol.*, 83: 652-658.

Willstaetter, R., Waldschmidt-Leitz, E., Memmen, F.. (1923) *Physiol.Chem.*, 125,93.

Winkler UK, Stuckmann M., 1979. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, 138: 663–670.

Wiseman, A. (1987). *Handbook of Enzymes Biotechnology*. Second Edition. Chapter 3. The Application of Enzymes in Industry s. 274-373.

Whyte, L.Y., Bourbonniere, L. and Greer, C.W. (1997) Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons by Psychrotrophic *Pseudomonas* Strains Possessing Alkane (alk) and Naphthalene (nah) Catabolic Pathways. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(9): 3719-3723.

Zeikus, J.G. (1979). *Enzyme Microb. Technol.* 1,243.

Zeman, N.W. and Mccrea, J.M. (1985). Alpha-amylase Production Using a Recombinant DNA Organism. *Cereal Foods World.* 30(1) : 777-780.

Zengin Ulakoğlu, E. (2006) *Enzimler İ.Ü. Cerrahpaşa.*

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel bilgiler

Adı Soyadı	Fazilet YILDIZ
Doğum Yeri ve Tarihi	Sivas, 13/11/1984
Medeni Hali	Bekar
Yabancı Dil	İngilizce
İletişim Adresi	Cumhuriyet Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 58140-Sivas
E-posta Adresi	<a href="mailto:fazileyildiz@hotmail.com.tr">fazileyildiz@hotmail.com.tr</a>

### Eğitim ve Akademik Durumu

Lise	Selçuk Anadolu Lisesi ( İngilizce),2003- Diploma Notu: 4.25 / 5.00
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, Fen – Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü,2008- Diploma notu: 92.08/100 Derece: Bölüm üçüncüsü
Yüksek Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, Fen – Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji -2011

### İş Tecrübesi

C. Ü. Tıbbi Genetik A.D. Biyolog, 2008-